

Aus dem Lehrstuhl für Pathologie  
Prof. Dr. F. Hofstädter  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

***UNTERSUCHUNG DER PROMOTORMETHYLIERUNG VON RASAL1  
UND PRKACB UND DEREN KORRELATION MIT HISTO- UND  
MOLEKULARPATHOLOGISCHEN PARAMETERN***

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Felix Steger

2014



Aus dem Lehrstuhl für Pathologie  
Prof. Dr. F. Hofstädter  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

***UNTERSUCHUNG DER PROMOTORMETHYLIERUNG VON RASAL1  
UND PRKACB UND DEREN KORRELATION MIT HISTO- UND  
MOLEKULARPATHOLOGISCHEN PARAMETERN***

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Felix Steger

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Dietmaier

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Oliver Kölbl

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie.....	1
1.2 Pathogenese.....	1
1.3 Familiäre adenomatöse Polypose.....	5
1.4 Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom.....	6
1.5 CpG-Insel-Methylator-Phänotyp.....	6
1.6 Molekulare Pfade zum kolorektalen Karzinom.....	9
1.7 Molekulare Marker.....	10
1.7.1 Insulin-like growth factor 2 (IGF2).....	10
1.7.2 Neurogenin 1 (NEUROG1).....	11
1.7.3 Katalytische Untereinheit $\beta$ der Proteinkinase A (PRKACB).....	11
1.7.4 RAS protein activator like 1 (RASAL1).....	12
<b>2 Zielsetzung.....</b>	<b>16</b>
<b>3 Patienten, Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
3.1 Patienten.....	17
3.2 Material.....	19
3.2.1 Chemikalien.....	19
3.2.2 Geräte.....	20
3.2.3 Verbrauchsmaterialien.....	21
3.2.4 Software.....	21
3.3 Methoden.....	21
3.3.1 DNA-Extraktion aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Material.....	21
3.3.2 Methylierungsanalyse mittels MethyQESD.....	22
3.3.2.1 Prinzip der MethyQESD.....	22
3.3.2.2 Arbeitsschritte der MethyQESD.....	23
3.3.2.3 Primer für MethyQESD.....	26
3.3.3 Expressionsuntersuchung mit RT-qPCR.....	27
3.3.3.1 RNA-Extraktion aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Material.....	27
3.3.3.2 Bestimmung der mRNA-Expression mittels relativer Quantifizierung.....	27
3.3.3.3 Primer für RT-qPCR.....	28
3.3.4 CIMP-Panel.....	28
3.3.5 Statistische Datenauswertung und -analyse.....	28
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
4.1 Methylierungsanalyse von IGF2.....	29

---

4.2 Methylierungsanalyse von NEUROG1.....	36
4.3 Ergebnisse PRKACB.....	41
4.4 Ergebnisse RASAL1.....	47
4.4.1 Methylierungsanalyse.....	47
4.4.2 RASAL1-Expressionsanalyse.....	52
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>55</b>
5.1 CIMP.....	55
5.1.1 IGF2.....	59
5.1.2 NEUROG1.....	59
5.2 PRKACB.....	60
5.3 RASAL1.....	61
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>79</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist einer der häufigsten malignen Tumoren in Deutschland. Jährlich erkranken knapp 75.000 Frauen und Männer an Darmkrebs, wobei sich diese Zahl zu etwa gleichen Teilen auf beide Geschlechter verteilt. Somit hat diese Krebsart bei beiden Gruppen die zweithöchste Inzidenz inne. Desgleichen belegt sie unter den Malignomen Platz zwei bzgl. der Mortalität, jährlich versterben 26,9 von 100.000 männlichen bzw. 17,0 von 100.000 weiblichen Einwohnern an KRK. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt bei Männern 69 Jahre, bei Frauen 75 Jahre. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 70. und 85. Lebensjahr. Im internationalen Vergleich verzeichnet Deutschland zusammen mit anderen Industrienationen mit westlichem Lebensstil am meisten Neuerkrankungen in Bezug auf die Einwohnerzahl. Daraus ergibt sich in der BRD ein Lebenszeitrisko von ca. 7 % für ein kolorektales Karzinom (RKI, 2006).

## 1.2 Pathogenese

Das kolorektale Karzinom kann über verschiedene Mechanismen entstehen. Grundsätzlich lässt sich die Genese aus verschiedenen Blickrichtungen herleiten: Geht man vom molekularpathologischen Standpunkt aus, so liegt der Entwicklung des Malignoms eine Instabilität zu Grunde, die ihren Ursprung in der DNA-Sequenz, auf chromosomaler oder auf epigenetischer Ebene haben kann. Im Zusammenhang mit den Sequenzveränderungen wurde der Begriff des „mutator pathway“ geprägt. Dieser beschreibt einen möglichen Entstehungsweg eines KRK: Durch Mutation wird ein Mismatchrepair-Gen (MMR-Gen), das für die DNA-Reparatur von Bedeutung ist, inaktiviert. Auf Grund der verminderten Funktionalität des MMR-Systems kommt es zur genomweiten Akkumulation von weiteren Mutationen (Thibodeau et al., 1993; Ionov et al., 1993), die zur Entstehung eines KRK führen kann (Markowitz et al., 1997). Dieses Geschehen ist insbesondere für das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) kennzeichnend (Parsons et al., 1993; Hemminki et al., 1994), es findet sich aber auch in sporadischen Tumoren zu ca. 10 – 15 % ein aktivierter „mutator pathway“ (Samowitz et al., 2001; Imai et al., 2008).

Liegt dagegen eine chromosomale Instabilität (CIN) vor, so spricht man vom „suppressor pathway“, dessen Name sich von der Ausschaltung verschiedener Tumorsuppressorgene herleitet (Lengauer et al., 1997). Der zu Grunde liegende Weg der Karzinogenese mit chromosomaler Instabilität wurde erstmals 1990 von Fearon und Vogelstein beschrieben. Man geht davon aus, dass 70 – 85 Prozent der KRK auf diesem Entwicklungsweg beruhen. Das zusammenführende Merkmal in diesen Tumoren ist die Aneuploidie (Rajagopalan und Lengauer, 2004; Kops et al., 2005). Kommt es in Darmepithelzellen zu einer biallelischen Inaktivierung des APC-Gens, ergibt sich konsekutiv eine Störung von dessen Funktion im Catenin-Signalweg sowie bei der Chromosomen-Segregation (Powell et al., 1992; Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997). Da das APC-Gen eine entscheidende Rolle für die Stabilität der Chromosomen spielt, verursacht dessen Funktionsverlust eine Instabilität auf chromosomaler Ebene mit Verlust und Zugewinn von Chromosomenmaterial. Auf diesem Wege können u. a. Aneuploidie und Polyploidie von Zellen entstehen. Dies wiederum kann zu einem „loss of function“ von Tumorsuppressorgenen und zusammen mit anderen Ereignissen zur Tumorigenese führen (Worthley et al., 2007). Besonders charakteristisch zeigt sich dieser „suppressor pathway“ in der Familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP), der eine Keimbahnmutation des APC-Gens zugrunde liegt (Kinzler und Vogelstein, 1996).

Neben diesen beiden Entstehungswegen mit direkter genomischer Alteration werden seit einiger Zeit ebenso epigenetische Veränderungen im Zusammenhang mit der Karzinombildung angeführt. Als Mechanismen kommen hierbei die Deazetylierung von Histon sowie die Methylierung von Cytosin in CpG-Dinukleotiden in Frage (Bird, 1986). Letztere tritt vor allem an sogenannten CpG-Inseln in der Promotorregion von Genen auf und hat bei unveränderter Gensequenz eine Minderexpression des zugehörigen Proteins zur Folge. Man bezeichnet diesen Prozess als „transcriptional silencing“. Sind davon Tumorsuppressor- oder Reparaturgene betroffen, fördert das die Entstehung von Malignomen (Baylin et al., 1998; Jones und Laird, 1999).

In einem anderen Pathogenesemodell wird die Interaktion von Tumorsuppressor- und Onkogenen mit sogenannten „gatekeeper“- und „caretaker“-Genen beschrieben. Eine Wächterfunktion spricht man Tumorsuppressorgenen zu, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind. Dagegen werden die an der DNA-Reparatur beteiligten Tumorsuppressorgene als „caretaker“ bezeichnet. Kommt es nun beispielsweise durch biallelische Inaktivierung zum Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens, so wird das Wachstum eines Zellklons enthemmt. Im Rahmen der Genese von KRK verfügt der

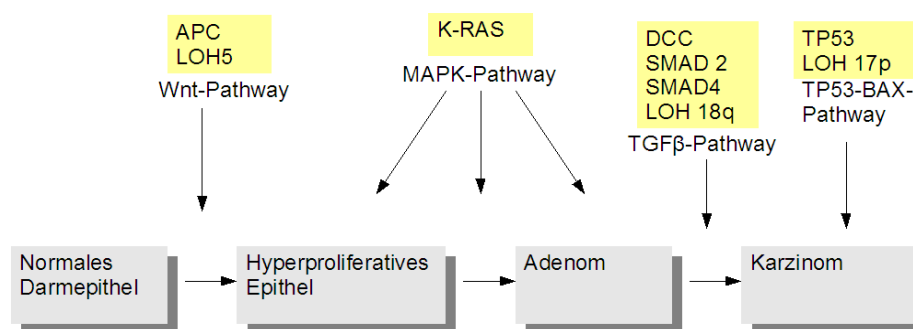


„gatekeeper“ APC wie oben beschrieben über zentrale, regulative Eigenschaften für die Proliferation, Differenzierung und Apoptose und gilt als Initiator der Karzinogenese. Auf Kinzler und Vogelstein geht die Hypothese zurück, dass die Mutation des „gatekeepers“ eine notwendige Voraussetzung für die Entstehung eines KRK ist. Den „caretaker“-Genen kommt dagegen eine andere Rolle im Rahmen der Neoplasiebildung zu. Als MMR-Gene wie z. B. MLH1 tragen sie direkt zur Stabilität des Genoms auf DNA-Ebene bei. Eine „loss of function“-Mutation in einem dieser Gene hat demnach zahlreiche nicht reparierte Mutationen zur Folge und kann so zu Mutationen u. a. von „gatekeepern“ beitragen, was wiederum das Risiko für ein Karzinom erheblich erhöht (Kinzler und Vogelstein, 1997).

Ferner kann die Pathogenese des KRK aus dem Blickwinkel der Vererbung betrachtet werden: In diesem Zusammenhang erfolgt die Einteilung in hereditäre und sporadische Tumoren. Allerdings lässt sich nicht jedes Malignom eindeutig in eine der beiden Kategorien einordnen, da noch nicht gänzlich geklärt ist, welche Elemente zur polygenen Vererbung beitragen können. Der Stellenwert der autosomal dominant monogenisch vererbten Neoplasien dagegen ist hinlänglich bekannt: Man führt etwa ein Prozent der KRK auf das APC-Syndrom und ein bis drei Prozent auf das HNPCC-Syndrom zurück (Aaltonen et al., 1998; Salovaara et al., 2000; Samowitz et al., 2001; Schofield et al., 2008). Des Weiteren existieren seltene Syndrome wie das Peutz-Jeghers-Syndrom, die kumulativ einen Anteil von weniger als ein Prozent ausmachen. Neben diesen autosomal dominant vererbten Tumorsyndromen entsteht ein beträchtlicher Anteil der KRK auf dem Boden einer polygenisch bedingten Prädisposition. So ist beispielsweise das Risiko für eine Person, deren Zwillingsgeschwister an Darmkrebs erkrankt ist, gegenüber der Normalbevölkerung für diese Erkrankung auf Grund der Alteration von Suszeptibilitätsgenen erhöht. Anhand von Zwillingstudien in skandinavischen Ländern konnte gezeigt werden, dass für einen Zwilling das relative Risiko für ein KRK um ein Vielfaches erhöht ist, je nach Geschlecht und Mono- oder Dizygotie liegt das relative Risiko zwischen 4,4 und 14,3 (Lichtenstein et al., 2000). Selbstverständlich können hierbei auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Der Anteil der polygenisch bedingten, sporadischen Malignome wird mit 30 bis 40 Prozent aller KRK geschätzt. Mit Hilfe von genomweiten Screenings konnten in den vergangenen Jahren einige der daran beteiligten Gene identifiziert werden.

Die Erkenntnisse aus der Molekularpathologie finden in der Beschreibung der Adenom-Karzinom-Sequenz ihre Verknüpfung mit der Makropathologie: Das lineare Modell der

Karzinogenese (siehe Abbildung 1.1) schildert die Progression eines Adenoms bis hin zum Malignom. Es wurde erstmals im Jahre 1974 von Kinzler und Vogelstein vorgestellt. Obgleich es in der Natur eines Modells liegt, dass es vereinfachenden und nicht allgemeingültigen Charakter aufweist, stellte dieses Konzept dennoch einen Meilenstein für das Verständnis der Karzinogenese gastrointestinaler Tumoren dar. Demnach sind Adenome als fakultative Präkanzerosen einzustufen – mit steigender Anzahl von Adenomen erhöht sich zugleich das Risiko für ein Kolonkarzinom. Das spiegelt sich in der Tatsache wieder, dass die Häufigkeit sowohl von Adenomen als auch Karzinomen mit zunehmendem Alter wächst (Kinzler und Vogelstein, 1974; Morson, 1974).



*Abbildung 1.1: Die Adenom-Karzinom-Sequenz: Der Weg der chromosomalen Instabilität führt über verschiedene genetische Veränderungen vom normalen Epithel über das Adenom zum Karzinom (modifiziert nach Fearon und Vogelstein, 1990).*

In Übereinstimmung mit der „gatekeeper“- Theorie fungiert die Inaktivierung von APC als Türöffner für die Hyperproliferation des Kryptengewebes und damit der Bildung

eines frühen Adenoms. Der Prozess der Adenomprogression schließt weitere Alterationen ein und mündet letztendlich in die Entstehung eines Karzinoms. Für diese Veränderungen kommen wiederum die genannten genetischen sowie epigenetischen Mechanismen in Frage. Letztlich sind in diesem Modell vier große Pathways beteiligt, die ebenso bei der Entstehung anderer Tumorentitäten eine entscheidende Rolle spielen. Allerdings ist die Linearität des Modells nach aktuellem Wissensstand nicht generell zutreffend, verschiedene Mutationen können in unterschiedlicher Reihenfolge die Karzinogenese vorantreiben.

### **1.3 Familiäre adenomatöse Polyposis**

Die entscheidende Funktion des APC-Gens in der Pathogenese des KRR wurde bereits erwähnt. Liegt an diesem Locus eine Keimbahnmutation vor, so kommt es zur Ausbildung einer FAP. Bei etwa einem Viertel der Betroffenen findet sich in der Familienanamnese kein Hinweis auf eine FAP, was auf eine Neumutation hindeutet. Entsprechend der Two-Hit-Hypothese von Knudson resultiert die Alteration in Verbindung mit einer somatischen Mutation des zweiten Allels in einer Deregulation der Wachstumshemmung (Knudson, 1996). Dadurch entsteht ein Polyp, der sich dann analog zum Konzept des „suppressor pathway“ in ein KRR weiterentwickeln kann. Im Rahmen der Erkrankung kommt es somit auf Grund der fehlenden Wächterfunktion des APC-Gens zu einer Polyposis des Kolon und Rektum (Bodmer et al., 1987). Da das Tumorsuppressorgen in vielen Geweben eine entscheidende Bedeutung für die Proliferation inne hat, steigt ebenso das Risiko für andere Neoplasien. Die verschiedenen Varianten der Krankheit können sich demzufolge auch in Epidermoidzysten, Osteomen und Desmoidtumoren manifestieren (Parks et al., 1970; Sturt et al., 2004). Dies ist beispielsweise bei FAP-Varianten wie dem Gardner- oder Turcot-Syndrom der Fall (Bilkay et al., 2004). Neben diesen Abarten ist die attenuierte FAP mit einer geringeren Anzahl von Polypen als weitere Entität bekannt (Lynch et al., 1995). Insgesamt weist das hereditäre Syndrom eine Penetranz von nahezu 100 Prozent für Karzinome auf. Erste Ausprägungen zeigen sich in der Regel schon in der zweiten Lebensdekade und sind in mehr als 90 Prozent aller Fälle maligne (Bisgaard et al., 1994).

## 1.4 Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom

Das ebenfalls monogenisch autosomal dominant vererbte HNPCC-Syndrom ist charakterisiert durch KRK, die im Median im 45. Lebensjahr auftreten, allerdings nicht auf dem Boden einer Polypose entstehen. Verantwortlich hierfür ist der vererbte Defekt eines MMR-Gens mit konsekutiver Instabilität des Genoms. Hierfür kommen neben MLH1 insbesondere die folgenden Loci in Frage: MSH2, MSH6, PMS2, PMS1 und MLH3 (Aaltonen et al., 1998; Lynch et al., 2004). Betrifft die genetische Instabilität Regulatoren von Proliferation und Differenzierung, so kann sie in die Karzinogenese münden (Parsons et al., 1993; Hemminki et al., 1994). Zudem findet sich eine sogenannte Mikrosatelliteninstabilität des Genoms, die man sich neben klinischen Kriterien in der Diagnostik zu Nutze macht: Als Mikrosatelliten bezeichnet man kurze repetitive Sequenzen, die insbesondere in Introns und intergenischen Bereichen auftreten. Bei einem Defekt des MMR-Systems kommt es in diesen Regionen besonders häufig zu Längenverschiebungen, die mittels Fragmentanalyse nachgewiesen werden können (Markowitz et al., 1995; Duval und Hamelin, 2002; Park et al., 2002). Unabhängig von den genannten, autosomal dominant vererbten, KRK gibt es sporadische Tumoren ähnlicher Herkunft mit MSI – bei diesen wurde die Mikrosatelliteninstabilität durch Hypermethylierung des Promotors und folglich Minderexpression des Genprodukts von MLH1 hervorgerufen (Kane et al., 1997). Als Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden zugrunde liegenden Pfaden, die zur Mikrosatelliteninstabilität führen, eignet sich die Mutationsanalyse des BRAF-Onkogens – dessen Mutation am Locus V600E spricht für eine nicht hereditäre Genese (Deng et al., 2004).

## 1.5 CpG-Insel-Methylator-Phänotyp

Die Expression von Genen steht in Zusammenhang mit der Methylierung ihrer Promotorregion an sogenannten CpG-Inseln. CpG-Dinukleotide weisen im Genom eine sehr ungleichmäßige Verteilung auf. Am 5'-Ende von bestimmten Genen existieren Ballungsräume des Dinukleotids mit 10- bis 20-fach erhöhtem Vorkommen im Vergleich zur durchschnittlichen Verteilung. Sie erstrecken sich meist auf eine Länge von insgesamt 1000 bis 2000 bp und werden als CpG-Inseln bezeichnet. Normalerweise sind diese Regionen weitestgehend unmethyliert. Jedoch kann es zum Einen mit zunehmendem Alter zu einer verstärkten Methylierung kommen, was als Typ-A-Hypermethylierung bezeichnet wird. Zum Anderen beobachtet man in Tumoren eine

Typ-C-Hypermethylierung in den Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen. Der CIM-Phänotyp beschreibt eine Untergruppe von KRK, bei denen eine übereinstimmende Promotorhypermethylierung von ausgewählten Tumorsuppressorgenen vorliegt. Nach der erstmaligen Beschreibung durch Toyota et al. im Jahre 1999 und weiteren Publikationen über Assoziationen mit bestimmten molekularen und klinischen Parametern (Toyota et al., 2000; Whitehall et al., 2002; van Rijnsoever et al., 2002; Nagasaka et al., 2004; Issa et al., 2004) entwickelte sich eine kontroverse Debatte über die epigenetische Charakterisierung des KRK. So wird die Existenz des CpG-Insel-Methylator-Phänotyp von manchen Autoren grundsätzlich angezweifelt (Esteller et al., 2000; Yamashita et al., 2003; Anacleto et al., 2005). Für die zugrunde liegenden diskrepanten Ergebnisse spielen vermutlich verschiedene Faktoren eine Rolle: zum Einen kommt es mit zunehmendem Alter zu einem Anstieg der aberranten Promotorhypermethylierung, der sich unabhängig von CIMP entwickelt (Toyota et al., 1999). Des Weiteren kamen bei den oben genannten Arbeiten mitunter verschiedene Markerpanels zum Einsatz, was folglich die Vergleichbarkeit der Daten erschwert. Letztlich geht die Tendenz jedoch in Richtung Akzeptanz des CIM-Phänotyps als eigenständige, separate Subgruppe der KRK (Samowitz et al., 2005; Weisenberger et al., 2006; Ogino et al., 2008). Bezüglich der zugrunde liegenden Loci hat das Panel nach Weisenberger et al., welches die Marker CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3 und SOCS1 beinhaltet, eine weite Akzeptanz erreicht. Es sind jedoch in der Literatur zahlreiche weitere Markerkombinationen diskutiert worden (Toyota et al., 1999; Park et al., 2003; Ogino et al., 2006; Shen et al., 2007; Tanaka et al., 2010; Kaneda und Yagi, 2011).

Im Folgenden findet sich eine Aufstellung der klinischen, histopathologischen und epidemiologischen Marker, die mit CIMP korrelieren (Weisenberger et al., 2006; Toyota und Issa, 1999; Nosho et al., 2008; Samowitz et al., 2005).

<b>CIMP+</b>	<b>CIMP-</b>
Proximale Tumorlokalisation	Distale Tumorlokalisation
Geringe Differenzierung	Hohe Differenzierung
MSI häufiger	MSI selten
BRAF-Mutation häufig	BRAF-Mutation selten
MLH1-Methylierung häufig	MLH1-Methylierung selten
$\beta$ -Catenin inaktiv	$\beta$ -Catenin aktiv
Längeres Überleben	Kürzeres Überleben
Höheres Alter	Geringeres Alter

*Tabelle 1.1: Charakteristika von CIMP+ und CIMP- (nach Weisenberger et al., 2006)*

Es ist allerdings zum großen Teil ungeklärt ob, und wenn ja, welcher kausale Zusammenhang zwischen den genannten Parametern und dem CIMP-Status besteht. Es wird vermutet, dass die Hypermethylierung des MLH1-Promotors im Zusammenhang mit dem CIMP-Entwicklungsweg steht, denn diese wurde nur bei CIMP-positiven KRK beobachtet. Man geht davon aus, dass im Rahmen des CIMP eine Inaktivierung von Tumorsuppressor- oder MMR-Genen auftritt, die dann den Weg der Karzinogenese voranschreiten lässt. So findet sich eine positive Korrelation zwischen CIMP+ und sporadischen MSI-Tumoren, wohingegen hereditäre KRK diesen Zusammenhang nicht zeigen (McGivern et al., 2004; Weisenberger et al., 2006). Eine auffällige Häufung von CIMP+ ist zudem bei serratierten Polypen zu beobachten, deren molekularpathologischer Entstehungsweg sich von dem anderer KRK-Präkanzerosen unterscheidet (Kambara et al., 2004; Vaughn et al., 2010). Mit dem Entwicklungsweg der chromosomalen Instabilität hingegen verhält es sich anders, es besteht eine inverse Korrelation zu CIMP (Issa, 2008).

Neben der Frage nach den molekularpathologischen Hintergründen stellt sich darüber hinaus die Frage nach der klinischen Relevanz der CIMP-Klassifikation. Eine prospektive Studie von van Rijnsoever et al. zeigte die Eignung von CIMP als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf Fluorouracil: diejenigen Patienten, deren Tumoren CIMP-assoziiert waren, wiesen ein signifikant erhöhtes Gesamtüberleben im Vergleich zu den CIMP- auf (van Rijnsoever et al., 2003).

## 1.6 Molekulare Pfade zum kolorektalen Karzinom

In der Zusammenschau der aktuellen molekularpathologischen Erkenntnisse ergeben sich mindestens drei verschiedene Pfade zur Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms. Somit ergibt sich kein lineares Progressionsmodell, zumal die gleichen Alterationen an verschiedenen Entwicklungswegen beteiligt sein können. Zudem scheint sich eine Assoziation der Karzinogenesewege mit bestimmten morphologischen Eigenschaften der präkanzerösen Adenome heraus zu stellen, nämlich mit den sessilen serratierten Adenomen, traditionellen serratierten Adenomen und tubulären Adenomen. In Abbildung 1.2 sind die Pfade dargestellt:

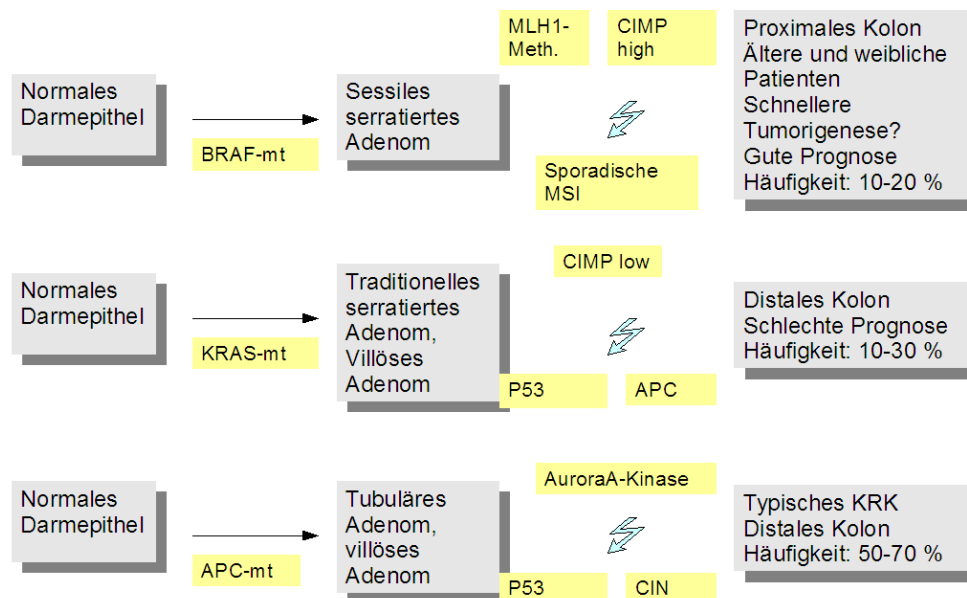


Abbildung 1.2: Molekulare Pfade des kolorektalen Karzinoms nach Issa, 2008; modifiziert nach Baretton, 2010

In diesem Modell wurde versucht, verschiedene Subgruppen wiederum in drei Hauptgruppen zusammen zu fassen. Potentiell bietet jedoch alleine die kombinierte Einteilung in CIMP high, CIMP low und CIMP- sowie MSI high, MSI low und MSS die Möglichkeit, neun verschiedene Subgruppen der KKR zu bilden. Derzeit ist noch unklar, inwiefern sich diese Subgruppen in den assoziierten molekularen Markern und klinischen Parametern tatsächlich unterscheiden, sodass verschiedene Einteilungsmodelle existieren (Jass, 2007; Issa, 2008; Ogino et al., 2011).

## 1.7 Molekulare Marker

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Promotormethylierung vier molekularer Marker untersucht, unter ihnen mit Insulin-like growth factor 2 (IGF2) und Neurogenin 1 (NEUROG1) zwei klassische CIMP-Marker, des Weiteren die katalytische Untereinheit  $\beta$  der Proteinkinase A (PRKACB) sowie RAS protein activator like 1 (RASAL1). Diese Marker sollen im Folgenden grundlegend beschrieben werden.

### 1.7.1 Insulin-like growth factor 2 (IGF2)

IGF2 spielt eine wichtige Rolle im pränatalen Wachstum. Die Expression von IGF2 wird durch genomisches Imprinting so reguliert, dass nur das paternale Allel transkribiert wird. Dementsprechend ließ sich im Tierversuch zeigen, dass Mäuse mit inaktivem väterlichem Allel kleinwüchsig sind, wohingegen jene mit inaktivem maternalem Allel eine normale Körpergröße aufweisen (Tilghman et al., 1993; Leighton et al., 1995). Ein Enhancer steuert die Transkription, der wiederum von einer „differentially methylated region“ (DMR) reguliert wird. Diese DMR liegt zwischen IGF2 und dem benachbarten Gen H19. Auf dem mütterlichen Chromosom bindet der Transkriptionsfaktor CTCF in der DMR, der in diesem Zustand die Interaktion von Enhancer und Gen blockiert. Auf dem paternalen Chromosom dagegen wird die Bindung von CTCF durch Methylierung der DMR verhindert, so dass der Enhancer ungehindert mit dem IGF2-Gen kommunizieren und die Expression verstärken kann (Bell et al., 1999; Kurukuti et al., 2006). Bei einer Deletion in der DMR kommt es zu einem „loss of imprinting“ (LOI) mit einer biallelischen Aktivierung von IGF2. Auf diese Art und Weise entsteht unter anderem das Beckwith-Wiedemann-Syndrom, ein Großwuchssyndrom (Ohlsson et al., 1993). Ebenso spielt das Gen eine Rolle im Kolon, es eignet sich unter anderem als Marker der Prädisposition für ein KRK. Hierbei scheinen sowohl LOI als auch eine Hypomethylierung einer direkt im IGF2-Gen lokalisierten DMR eine Rolle zu spielen (Ito et al., 2008; Murrell et al., 2008; Cui et al., 2002; Kaneda und Feinberg, 2005). Zudem steht IGF2 als CIMP-Marker im Mittelpunkt des Interesses. Nach Weisenberger et al. ist er Teil eines Panels zur Klassifizierung des CIMP-Status in kolorektalen Tumoren (Weisenberger et al., 2006). Hierfür macht man sich die Hypermethylierung des IGF2-Promotors bei CIMP-positiven Tumoren zu Nutze.



### 1.7.2 Neurogenin 1 (NEUROG1)

Ein weiterer Marker für den CIMP-Status ist das Gen Neurogenin 1 (NEUROG1). Das Genprodukt ist ein „basic helix-loop-helix“-Transkriptionsfaktor, der die neuronale Differenzierung von Stammzellen fördert. In Medulloblastomen ist die Expression dieses Gens mit einer schlechten Prognose assoziiert (Sommer et al., 1996; Ma et al., 1996; Salsano et al., 2007). Für das KRK ist die Funktion von Neurogenin 1 nicht bekannt. Wie auch für IGF2 besteht bezüglich NEUROG1 eine hochgradige Korrelation zwischen positivem CIMP-Status und Hypermethylierung des Gen-Promotors. Aus diesem Grund eignet sich auch Neurogenin 1 als CIMP-Surrogatmarker (Weisenberger et al., 2006).

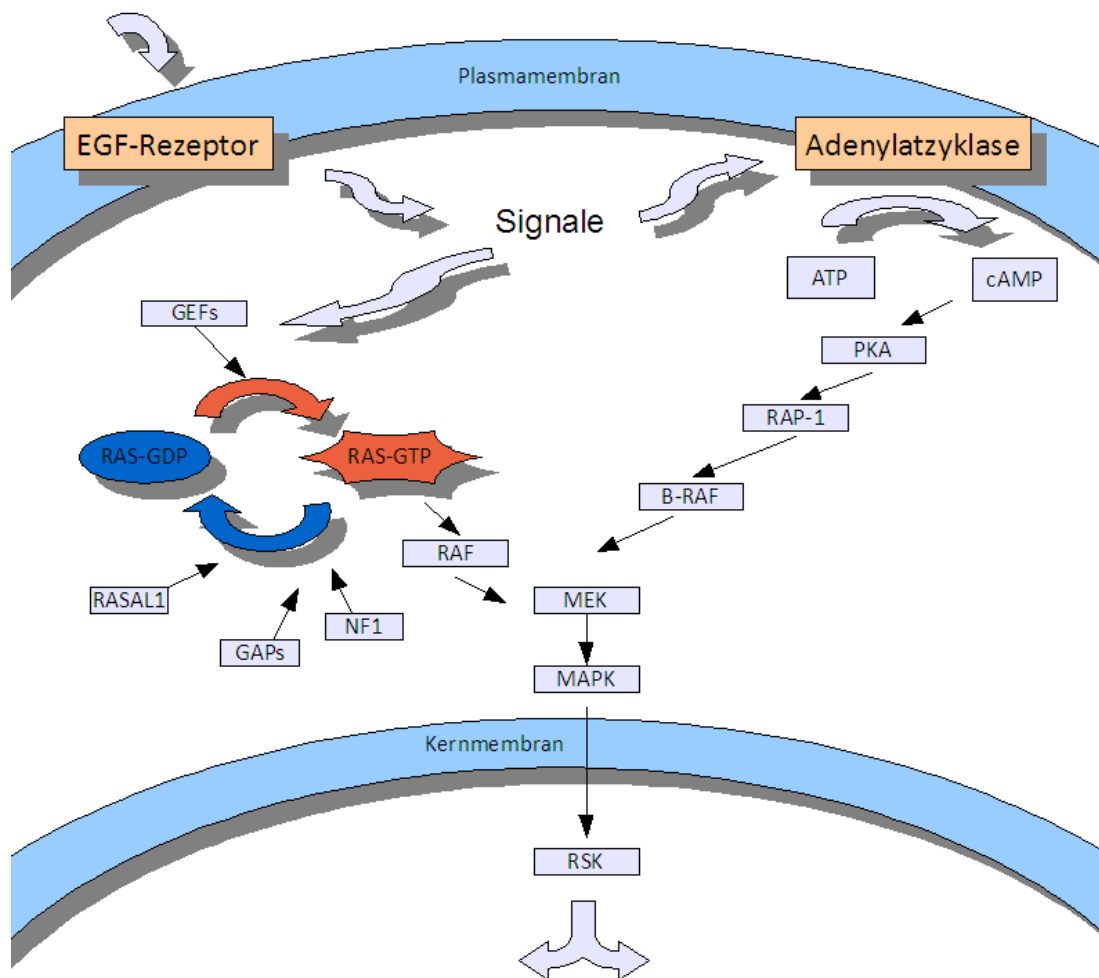
### 1.7.3 Katalytische Untereinheit $\beta$ der Proteinkinase A (PRKACB)

Die Proteinkinase A (PKA) ist ein intrazelluläres Enzym mit Serin-Threonin-Kinase-Aktivität, das eine zentrale Rolle in der Regulation von Wachstum und Differenzierung spielt. Es agiert in Abhängigkeit von cAMP, dessen Produktion wiederum von G-Proteinen gesteuert wird (Ward et al., 1995; Coulonval et al., 1997). Die reversible Phosphorylierung durch Kinasen ist ein häufiger zellulärer Regulationsmechanismus in Eukaryoten und in zahlreiche Prozesse involviert. Die Proteinkinase A ist ein Tetramer aus jeweils zwei katalytischen und regulatorischen Untereinheiten. Zwei unterschiedliche regulatorische Untereinheiten RI und RII führten zu den verschiedenen Bezeichnungen PKAI und PKAII unabhängig vom Typ der katalytischen Untereinheit, die in den Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  beschrieben sind. In dieser Arbeit lag der Fokus auf dem Gen, das für die katalytische Untereinheit  $\beta$  kodiert. Die PKA steht auf Grund ihrer Beteiligung in zellulären Regulationsvorgängen in Zusammenhang mit Karzinogenese und Tumorwachstum. Nach bisherigen Untersuchungen an Zelllinien und KRK scheint die Kinase in Abhängigkeit von ihrer regulatorischen Untereinheit entweder wachstumsfördernden oder antiproliferativen Effekt zu zeigen (Carlson et al., 1999; Bradbury et al., 1994). Zum einen wurde festgestellt, dass die Untereinheit C- $\alpha$  die Immunreaktion von T-Zellen steuert (Funderud et al., 2008). Zum anderen fanden sich im Mausmodell Hinweise, dass die Inaktivierung der katalytischen Untereinheiten zu einer Reduktion des membranständigen „epithelial growth factor receptor“ (EGFR) führt (Oksvold et al., 2008). Zudem zeigte sich, wie EGFR und PKA auch auf direktem Wege interagieren können: Die Kinase bindet an das Protein Grb-2 des EGF-Rezeptors, aktiviert auf diese Weise den MAP-Kinase-Weg und induziert so die Zellproliferation

(Tortora und Ciardiello, 2006; Tortora et al., 1997). Bisher ist allerdings unklar, inwieweit bei der Regulation der PKA und insbesondere der katalytischen Untereinheit epigenetische Mechanismen eine Rolle spielen. Somit war es von Interesse, die Promotormethylierung der PRKACB in KRC zu untersuchen und mit der von klassischen CIMP-Markern zu vergleichen.

#### **1.7.4 RAS protein activator like 1 (RASAL1)**

RAS-Proteine gehören zur Gruppe der sogenannten kleinen GTPasen und sind entscheidend an der Steuerung von Zellwachstum und -differenzierung sowie Apoptose beteiligt (Sprang, 1997; Symons und Settelmann, 2000). Die Untergruppen K-RAS, H-RAS und N-RAS existieren jeweils in einer aktiven und einer inaktiven Konformation, die durch Bindung von GTP oder GDP gekennzeichnet sind. Ist GTP gebunden, so aktiviert das Protein einen Signalweg, der in den MAP-Kinase-Weg mündet und mitogenen Effekt hat. Liegt hingegen gebundenes GDP vor, so ist die Signaltransduktion abgeschaltet (Takai et al., 2001). RAS-Proteine besitzen eine intrinsische GTPase-Aktivität, wodurch sie auf sich selbst hemmenden Einfluss ausüben. Nach heutiger Einschätzung scheint die intrinsische Aktivität eine eher geringe Bedeutung zu haben (Ivashita et al., 2008). Zusätzlich sind für das physiologische Gleichgewicht aktivierende und inaktivierende Faktoren von Nöten. Das sind zum Einen „GTPase-activating proteins“ (GAPs), welche die Hydrolyse von GTP zu GDP stimulieren und dadurch indirekt RAS inhibieren. Auf der anderen Seite stimulieren „guanine nucleotide exchange factors“ (GEFs) die Funktion von RAS-Proteinen, indem sie den Austausch von GDP zu GTP unterstützen (Bernards und Settelmann, 2004).



*Abbildung 1.3: Rolle von RAS, RAF und RASAL1 im MAP-Kinase-Pathway. RAS schaltet in der aktiven Konformation mit gebundenem GTP den MAP-Kinase-Weg an und führt so zu Zellproliferation. RASAL1, NF1 und weitere GAPs stimulieren die Umwandlung von RAS in die inaktive Form mit gebundenem GDP. GEFs weisen antagonistischen, fördernden Einfluss auf. BRAF hat wie RAS stimulierenden Einfluss im MAPK-Weg (modifiziert nach [www.cellsignaling.com](http://www.cellsignaling.com)).*

In KRK können verschiedene Störungen im RAS-RAF-MAPK-Signalweg beobachtet werden. Die Mutation von KRAS tritt in 40 – 45 Prozent der Tumoren auf (Samowitz et al., 2000; Brink et al., 2003; Ogino et al., 2009) und gilt als maßgeblicher Schritt in der Entstehung von kolorektalen Adenomen: auf Grund einer Konformationsänderung der Guanin-bindenden Tasche ist RAS nicht mehr in der Lage, GTP zu hydrolysieren.

Zugleich büßt das Protein seine Fähigkeit zur Interaktion mit den inhibierenden Faktoren ein. Diese Veränderungen haben eine Stabilisation des RAS-GTP-Komplexes zur Folge, wodurch es zu einer Überstimulation des MAPK-Signalwegs mit verstärkter Proliferation kommt (Khosravi et al., 1998). Eine vergleichbare Auswirkung hat die Mutation von BRAF, die mit CIMP+ Tumoren assoziiert ist, insbesondere in serratierten Adenomen (Weisenberger et al., 2006; Baretton et al., 2010). Sie resultiert ebenso in einer Überaktivierung der MAP-Kinase. Interessanterweise scheinen in KRK die Mutationen von KRAS und BRAF nicht gleichzeitig aufzutreten, wobei der zugrunde liegende Mechanismus letztlich nicht geklärt ist (Rajagopalan et al., 2002; Ogino und Goel, 2008).

Neben Mutationen im RAS-Protein selbst können desgleichen Inaktivierungen von GAPs einen Arrest des Proteins in der aktiven Konformation hervorrufen. Eine Alteration des für NF1 kodierenden Gens ist beispielsweise für die Neurofibromatose verantwortlich, bei der es zu zahlreichen benignen und malignen Neoplasien kommen kann (Menon et al., 1990). Weitere Proteine haben als GAPs eine bedeutsame Rolle für die RAS-Regulation in malignen Tumoren. Zusätzlich zu p120, den Syn-GAPs und RASA1 bis RASA4 ist dies RASAL1. Die Aktivität von RASAL1 ist vom Kalzium-Stoffwechsel der Zelle abhängig, indem RASAL1 über eine Verankerung in der Plasmamembran die Frequenz von  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen ableitet und verarbeitet (Walker et al., 2004).

Erstmals wurde RASAL1 von Kolfschoten et al. als alternativer Aktivator der Tumorigenese unter Regulation von PITX1 diskutiert. Zudem wurde gezeigt, dass die Expression von RASAL1 in verschiedenen Tumor-Zelllinien und soliden Malignomen unter anderem von Nasopharynx, Brust und Ösophagus supprimiert ist, wohingegen beispielsweise RASA4 in Normal- und Tumorgewebe vergleichbar exprimiert wird (Jin et al., 2007). Darüber hinaus wurden verschiedene mögliche Mechanismen für die Stilllegung des RASAL1-Gens untersucht: der Transkriptionsfaktor PITX1 von RASAL1 wird hierbei kontrovers diskutiert (Kolfschoten et al., 2005; Jin et al., 2007; Ohta et al., 2009; Calvisi et al., 2011).

Zudem zeigte sich zunächst in Zelllinien als epigenetischer Mechanismus des Silencings die Methylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich des Gens (Jin et al., 2007; Ohta et al., 2009). Bislang wurde dieser Weg der Inaktivierung jedoch nur an einem kleinen Kollektiv (n=30) mit Tumoren von Kolon und Rektum untersucht (Calvisi et al., 2011). Daten mit größerer Fallzahl liegen jedoch zur Expression in KRK vor. Demnach weisen

mehr als 40 % des untersuchten Kollektivs (n=64) eine reduzierte RASAL1-Expression auf. Ferner ließ sich ein Rückgang der Expression bereits in großen Adenomen beobachten, jedoch nicht in kleinen. Darüber hinaus fanden sich signifikante Korrelationen der RASAL1-Expression mit distaler Tumorlokalisation, KRAS-Wildtyp und Überexpression von TP53 (Ohta et al., 2009).

Nach den vorliegenden Daten liegt es nahe, die Promotorhypermethylierung von RASAL1 und deren Zusammenhang mit der mRNA-Expression in einem großen, repräsentativen Kollektiv zu untersuchen.

## 2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum Einen der molekulare Marker PRKACB hinsichtlich seiner Eignung als prädiktiver oder prognostischer Parameter in KRK untersucht werden. Der Fokus lag hierbei auf der Analyse der Promotormethylierung und Untersuchung im Zusammenhang mit verschiedenen histo- und molekularpathologischen Markern. Insbesondere sollte eine vergleichende Analyse mit dem CpG-Insel-Methylator-Phänotyp in den untersuchten KRK durchgeführt werden, um festzustellen, ob mögliche epigenetische Veränderungen lediglich im Zusammenhang mit genereller Hypermethylierung zu sehen sind. Somit war ebenso eine Einstufung der untersuchten KRK in CIMP+ und CIMP- mittels eines Markerpanels Teil der Arbeit.

Zum Anderen sollte der Marker RASAL1 mit folgenden zentralen Fragestellungen untersucht werden:

- Tritt in kolorektalen Tumoren eine Hypermethylierung der Promotorregion von RASAL1 auf?
- Wie häufig tritt diese im untersuchten Kollektiv auf?
- Steht diese in Zusammenhang mit einer verminderten Expression von RASAL1 in den betroffenen Tumoren?
- Korreliert das Vorliegen der Promotorhypermethylierung mit dem CpG-Insel-Methylator-Phänotyp?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen RASAL1-Methylierungsstatus und KRAS-Mutationsstatus der KRK?

### 3 Patienten, Material und Methoden

#### 3.1 Patienten

Das Grundkollektiv dieser Arbeit besteht aus 156 Patienten. Folgende Einschlusskriterien wurden verwendet:

Alter bei Diagnose des kolorektalen Karzinoms mindestens 18 Jahre
keine Behandlung des kolorektalen Karzinoms vor Entnahme des Tumormaterials mit Ausnahme von neoadjuvanter Radiochemotherapie
Keine Behandlung eines anderen Malignoms bis fünf Jahre vor dem Diagnosezeitpunkt
Keine andere schwerwiegende Erkrankung, die die Lebenserwartung auf unter ein Jahr beschränkt
Bei negativem Nodalstatus müssen mindestens zwölf tumorfreie Lymphknoten vorliegen, um eine eindeutige Beurteilung des UICC-Stadiums zu ermöglichen

*Tabelle 3.1: Einschlusskriterien*

Für die RASAL1-Methylierungsanalyse wurden dem Grundkollektiv auf Grund der seltenen Methylierungsereignisse 51 weitere Patienten hinzugefügt. Somit ergibt sich eine Gesamtzahl von 207 Patienten, die im Folgenden beschrieben werden.

Die Geschlechterverteilung beträgt 0,88 ( $n_{\text{weiblich}} = 97$ ;  $n_{\text{männlich}} = 110$ ). Der überwiegende Teil der Patienten war zum Diagnosezeitpunkt weniger als 70 Jahre alt ( $n = 129$ ; 62 %).

Die histopathologischen Kerngrößen sind im Gesamtkollektiv wie folgt verteilt:

T-Status	Häufigkeit	Prozent
pT1	2	1
pT2	17	8,2
pT3	127	61,4
pT4	61	29,4
<b>Gesamt</b>	207	100,0

*Tabelle 3.2: Verteilung des T-Status*

N-Status	Häufigkeit	Prozent
pN0	15	7,2
pN1	119	57,5
pN2	73	35,3
<b>Gesamt</b>	207	100,0

*Tabelle 3.3: Verteilung des N-Status*

Es sind Präparate jeden 'T- und N-Status' enthalten, allerdings überwiegen bei Weitem pT3-Tumoren mit Lymphknoten-Status pN1. Bezüglich des Gradings wurden die Mehrzahl der Tumoren in Kategorie G2, gefolgt von G3, eingestuft. Nur bei wenigen Patienten lag zum Diagnosezeitpunkt bereits ein metastasiertes Leiden vor, dies war bei 5,3 Prozent der Untersuchten der Fall. Dieser geringe Anteil lässt sich durch die Selektion von M0-Patienten für die experimentellen Analysen erklären. Demzufolge befanden sich zum Diagnosezeitpunkt nur diese 13 Patienten im Stadium IV nach UICC-Klassifikation, der überwiegende Anteil gehörte hingegen dem Stadium III an.

UICC-Stadium	Häufigkeit	Prozent
<b>I</b>	0	0
<b>II</b>	15	7,2
<b>III</b>	178	86,0
<b>IV</b>	14	6,8
<b>Gesamt</b>	207	100,0

*Tabelle 3.4: Verteilung des UICC-Stadiums*

Grading	Häufigkeit	Prozent
<b>G1</b>	1	0,5
<b>G2</b>	129	62,3
<b>G3</b>	77	37,2
<b>Gesamt</b>	207	100,0

*Tabelle 3.5: Verteilung des Gradings*

M-Status	Häufigkeit	Prozent
<b>M0</b>	193	93,2
<b>M1</b>	14	6,8
<b>Gesamt</b>	207	100,0

*Tabelle 3.6: Verteilung des M-Status*



## 3.2 Material

### 3.2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Buffer PKD, RBC, RPE <sup>®</sup>	Qiagen, Hilden
Buffer Tango <sup>®</sup>	Fermentas, Burlington
DNase Booster Buffer	Qiagen, Hilden
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
MagNA Pure <sup>®</sup> Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Oligonukleotide	Metabion, Martinsried
Proteinase K	Qiagen, Hilden
QuantiTect <sup>®</sup> SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsendonukleasen Hin6I, XbaI und DraI	Fermentas, Burlington
RNase AWAY <sup>®</sup>	Molecular BioProducts, San Diego (USA)
RNase-freie DNase I	Qiagen, Hilden
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden
RNeasy FFPE Kit <sup>®</sup>	Qiagen, Hilden

*Tabelle 3.7: Verwendete Chemikalien*

### 3.2.2 Geräte

Brutschrank	Heraeus, Hanau
<b>DNA- und RNA-Vermessung</b>	
NanoDrop® ND-1000	Peqlab, Erlangen
<b>DNA-Extraktor</b>	
MagNAPure®	Roche Diagnostics, Mannheim
<b>Kühl- und Gefrierschränke</b>	
Liebherr Premium	Liebherr, Biberach an der Riss
Liebherr Komfort	Liebherr, Biberach an der Riss
<b>Heizblöcke</b>	
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
<b>Pipetten</b>	
Finnpipette®	LabSystems, Qickborn
<b>Thermocycler</b>	
LightCycler® II	Roche Diagnostics, Mannheim
<b>Vortexer</b>	
MS2 Minishaker	IKA®, Wilmington (USA)
<b>Waagen</b>	
R160P, L2200S	Sartorius, Göttingen
<b>Zentrifugen</b>	
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Lightcycler Carousel Centrifuge	Roche Diagnostics, Mannheim

*Tabelle 3.8: Verwendete Geräte*

### 3.2.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Pipettenspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
LightCycler® Capillaries	Roche Diagnostics, Mannheim
Einmalhandschuhe	VWR International, Leuven (Belgien)
Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
RNeasy MinElute® Columns	Qiagen, Hilden
PCR-Softstrips 0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf

Tabelle 3.9: Verwendete Verbrauchsmaterialien

### 3.2.4 Software

Software	Hersteller
LightCycler®-Software 3.5.3	Roche Diagnostics, Mannheim
PASW Statistics 17.0 und 20.0	IBM SPSS, München
Primer3	WhiteHead-Institute, Cambridge
RelQuant®	Roche Diagnostics, Mannheim

Tabelle 3.10: Verwendete Software

## 3.3 Methoden

### 3.3.1 DNA-Extraktion aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Material

Zur DNA-Isolierung aus FFPE-Material kam der Vollautomat MagNA Pure® (Roche Diagnostics, Mannheim) zum Einsatz. Die Verwendung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Zur DNA-Gewinnung wurden 5 – 10 µm dicke Schnitte mit dem Schlittenmikrotom gewonnen. Nach Markierung des Tumorgewebes durch den Pathologen wurde Material aus dem malignen Bereich gewonnen und dieses

anschließend mit Hilfe von Xylol entparaffiniert sowie mit einer absteigenden Ethanol-Reihe hydriert. Daraufhin wurden durch Lysepuffer die enthaltenen Zellen lysiert und anschließend denaturierte Proteine mit Proteinase K enzymatisch abgebaut. Mehrere Waschvorgänge dienten zur Aufreinigung der Nukleinsäuren mit Entfernung abgebauter Proteine und weiterer Partikel. Anschließend wurde die DNA im Elutions-Puffer von den magnetischen Glaspartikeln getrennt und gekühlt asserviert.

### 3.3.2 Methylierungsanalyse mittels MethyQESD

#### 3.3.2.1 Prinzip der MethyQESD

Die MethyQESD wurde zur Analyse des Methylierungsstatus von Promotorregionen eingesetzt. Das Untersuchungsverfahren gliedert sich in zwei Schritte auf:

- Schritt 1: Methylierungsspezifischer Verdau von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen
- Schritt 2: relative Quantifizierung von methylierter DNA durch real-time-PCR

Schritt 1 basiert auf der methylierungsabhängigen Funktion der Restriktionsendonuklease *Hin6I*. Diese schneidet DNA anhand der spezifischen Erkennungssequenz CGCG – allerdings nur dann, wenn an dieser Stelle keine Methylierung vorliegt. Diese Eigenschaft macht man sich zunutze um einen Quantifikatorverdau herzustellen, bei dem die vorliegende DNA in Abhängigkeit von den vorhandenen *Hin6I*-Schnittstellen und deren Methylierungsstatus fragmentiert wird. Des Weiteren kommen die methylierungsunabhängigen Restriktionsenzyme *XbaI* und *DraI* zum Einsatz. Sie werden einem Kalibratorverdau zugegeben, der exakt die gleiche Menge an DNA wie der Quantifikatorverdau enthält. Diese beiden Enzyme machen das Template der späteren Amplifikation in der PCR besser zugänglich und ermöglichen somit eine gleiche Amplifizierungseffizienz von Quantifikator und Kalibrator.

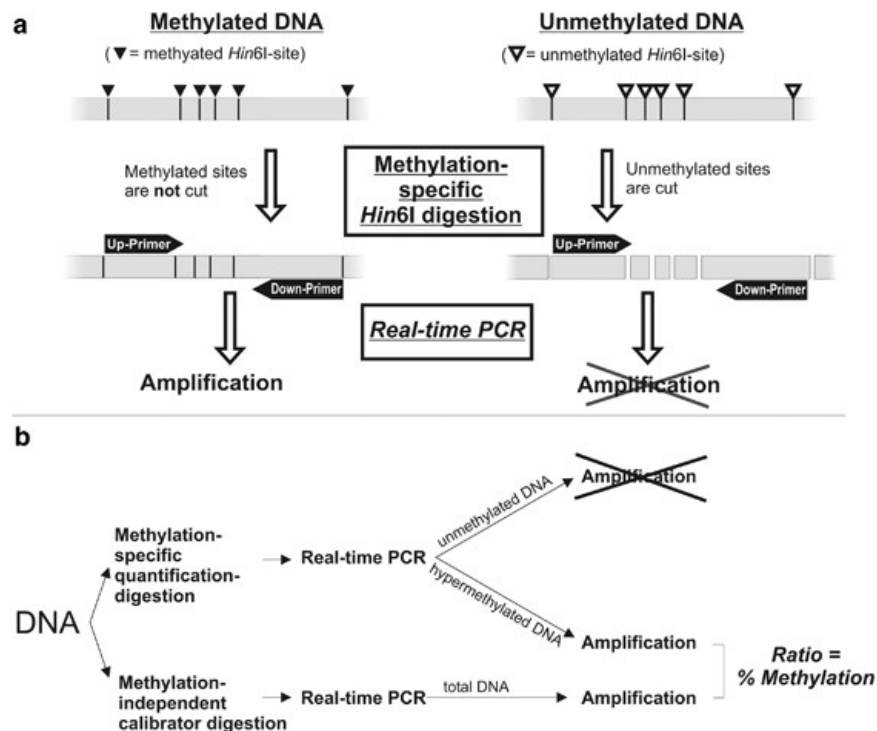


Abbildung 3.1: Prinzip der MethyQESD nach Bettstetter et. al, 2008

Durch diese wird im zweiten Schritt der Anteil an methylierter DNA in der gegebenen DNA-Extraktion bestimmt. Dabei werden Vorwärts- und Rückwärtsprimer so gewählt, dass sie die zu untersuchende Region des Genpromotors einschließen. Der betreffende Bereich sollte mindestens eine Schnittstelle für *Hin6I* enthalten. Ferner gilt es zu beachten, dass im Amplikon nicht die Erkennungssequenz für die Enzyme des Kalibratorverdaus enthalten sein darf, da sonst ein falscher Vergleichswert bestimmt wird. Sowohl Quantifikator- als auch Kalibratorverdaus werden nun im gleichen Ansatz in die real-time-PCR eingesetzt. Unter Verwendung der  $C_t$ -Werte der beiden Ansätze sowie der PCR-Effizienz  $E$  (s. Tabelle 3.15) errechnet sich der Grad der Methylierung an der untersuchten Stelle wie folgt:

$$\text{Methylierung in Prozent} = E^{(C_t \text{ Kal} - C_t \text{ Quant})} * 100$$

### 3.3.2.2 Arbeitsschritte der MethyQESD

In Arbeitsschritt 1 wurden Quantifikator- und Kalibratorverdaus hergestellt. Im Quantifikatoransatz wurden 90 U *Hin6I* sowie im Kalibratoransatz jeweils 45 U *XbaI*

und *DraI* (jeweils hergestellt von Fermentas, Burlington) in 6 µl 1xTango™-Puffer gelöst. In beiden Ansätzen wurden 15 µl DNA mit einer Konzentration von 40 bis 300 ng/µl gegeben (Masse 0,6-4,5 µg) und über Nacht bei 37 ° Celsius inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Deaktivierung der Enzyme durch 20-minütiges Erhitzen der Ansätze auf 70 ° Celsius. Die fertigen Verdauungen wurden bei -20 ° Celsius gelagert.

<b>Quantifikatorverdau</b>	<b>Kalibratorverdau</b>
6 µl Tango-Puffer	6 µl Tango-Puffer
9 µl <i>Hin6I</i>	je 4,5 µl <i>XbaI</i> und <i>DraI</i>
30 µl H <sub>2</sub> O	30 µl H <sub>2</sub> O
15 µl DNA	15 µl DNA
Gesamtvolumen 60 µl	Gesamtvolumen 60 µl

*Tabelle 3.11: Pipettierschema für Quantifikator- und Kalibratorverdau*

In Arbeitsschritt 2 wurden jeweils 2,5 µl Quantifikator- und Kalibratorverdau direkt ohne weitere Aufreinigung in eine real-time-PCR eingesetzt. Diese wurde unter Verwendung von QuantiTect® SYBR Green PCR Kit in einem Gesamtansatzvolumen von 20 µl durchgeführt.

<b>Quantifikator-PCR</b>	<b>Kalibrator-PCR</b>
7,1 µl H <sub>2</sub> O	7,1 µl H <sub>2</sub> O
10 µl QuantiTect® SYBR Green PCR Kit	10 µl QuantiTect® SYBR Green PCR Kit
0,4 µl jeweiliger Primer	0,4 µl jeweiliger Primer
2,5 µl Quantifikatorverdau	2,5 µl Kalibratorverdau
Gesamtvolumen 20 µl	Gesamtvolumen 20 µl

*Tabelle 3.12: Pipettierschema PCR*

Es kamen sowohl Two-Step- als auch Three-Step-PCR zum Einsatz. Alle PCRs wurden am Lightcycler II durchgeführt. Die gewählten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3.13 und Tabelle 3.14 zusammenfassend dargestellt, im Anhang finden sich die detaillierten Protokolle.

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	15 Minuten
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden
Primerhybridisierung und Elongation	s. unten	20 Sekunden

*Tabelle 3.13: Reaktionsschritte und -einstellungen Two-Step-PCR*

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	15 Minuten
Denaturierung	95 °C	10 Sekunden
Primerhybridisierung	60 °C	17 Sekunden
Elongation	72 °C	8 Sekunden
Fluoreszenzmessung	83 °C	2 Sekunden

*Tabelle 3.14: Reaktionsschritte und -bedingungen Three-Step-PCR*

Die Schmelzkurven wurden erstellt, indem die Produkte von 55 auf 98 ° C erhitzt und währenddessen kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen wurde. Die Analyse der  $C_t$ -Werte der Ansätze erfolgte anhand des second derivate maximum, bei Ungenauigkeit dieser Methode wurden fit points verwendet. Die erhaltenen  $C_t$ -Werte wurden zusammen mit der PCR-Effizienz in oben genannte Formel eingesetzt, woraus sich der Grad der Methylierung ergab. Zur Bestimmung der Effizienz wurden Standardkurven erstellt. Unter Verwendung von deren Steigung  $s$  ergibt sich die Effizienz  $E$ :

$$E = 10^{-1/s}$$

Als Negativkontrolle wurde anstatt der Patienten-DNA unmethylierte, aus Blut isolierte, DNA auf die oben beschriebene Weise verdaut und der PCR zugeführt. Analog dazu kam DNA aus der KRK-Zelllinie SW48 als Positivkontrolle zum Einsatz.

Untersuchte Gene	PCR-Effizienz E	Annealing-Temperatur (° Celsius)
IGF2	1,92	66
NEUROG1	2	66
PRKACB	1,99	60
RASAL1	1,99	66

*Tabelle 3.15: Werte der PCR-Effizienz bei den untersuchten Genen*

### 3.3.2.3 Primer für MethyQESD

Alle Primer wurden unter Verwendung der Software Primer3 entwickelt. Die Primer waren zwischen 18 und 21 Basenpaare lang und wurden bis auf PRKACB für eine Two-Step-PCR entwickelt.

Primernamen	Sequenz (5' → 3')	Länge Primer (bp)	Schmelzpunkte der Primer (° C)	Länge PCR- Produkt (bp)
<b>PRKACB MSDig F1</b>	CGC CTG CGA AGA TAC AGT CG	20	61,3	100
<b>PRKACB MSDig R1</b>	CGG GCA GAC ACT CCC CCT TC	20	69,4	
<b>IGF2 MSDig F2</b>	GCC TCC TGG CCC ACG CCT	18	71,8	107
<b>IGF2 MSDig F2</b>	CCC GGG ACG GGA GTC AGC AGC	21	73,5	
<b>NEUROG1 MSDig F3</b>	TGG CCT CAG GAC CCC TTA AGT	21	65,6	99
<b>NEUROG1 MSDig R3</b>	GCC GCC TCG CTC CAT TCA CC	20	68,2	
<b>RASAL1 MSDig F2</b>	CTC CAG ACG CCT CGG CAA GAG	21	67,2	91
<b>RASAL1 MSDig R3</b>	AGC GCC CGT CCG GAC TCT AC	20	68,4	

*Tabelle 3.16: Charakteristika der für die Methylierungsanalyse verwendeten Primer und der PCR-Produkte*



### **3.3.3 Expressionsuntersuchung mit RT-qPCR**

#### **3.3.3.1 RNA-Extraktion aus Formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Material**

Zur Isolierung von RNA aus den Paraffinschnitten kam der RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben zum Einsatz. Die Markierung des relevanten Gewebes und Entparaffinierung erfolgte analog zu den Schritten bei der DNA-Isolierung (s. 3.3.1). Im Anschluss überführte man das gewünschte Gewebe in ein Eppendorf-Cup mit folgender Erhitzung auf 65 ° C für 30 Minuten im Thermomixer, um das Ethanol zu verdampfen und zu entfernen. Dann wurde das Pellet in Lysepuffer mit Proteinase K gelöst und gevortex. Nach erneuter Inkubation und Addition von RBC-Puffer wurde die DNA-Elimination mit Hilfe der gDNA-Eliminator-Säule (Qiagen, Hilden) vorgenommen. Die eliminierte genomische DNA mit fragmentierter DNA wurde verworfen und der Durchlauf für die weitere Isolierung verwendet. Nach Übertragung in eine RNeasy MinElute® Säule und mehreren Zentrifugierungen mit Verwerfen des Durchlaufs wurde der Säule RPE-Puffer hinzugefügt und nach wiederholter Zentrifugierung ebenso der Durchlauf verworfen. Die an den Säulchen verbliebene RNA wurde mittels RNase-freiem Wasser in einem Eppendorf-Cup gelöst und unmittelbar bei -80 ° C konserviert.

#### **3.3.3.2 Bestimmung der mRNA-Expression mittels relativer Quantifizierung**

Die oben beschriebene Methode zur RNA-Isolierung fand für die Extraktion von RNA sowohl aus Tumor- als auch Normalgewebe Verwendung. Im Folgenden wurde die mRNA-Expression von RASAL1 in Relation zu derjenigen des Haushaltsgens TAX1BP1 analysiert. Dies erfolgte nach Umwandlung der mRNA mittels reverser Transkriptase in cDNA via RT-qPCR. Aus den gewonnenen C<sub>t</sub>-Werten lässt sich unter Verwendung des Programms RelQuant 1.01® das Expressionverhältnis von Zielgen im Verhältnis zum Kalibrator TAX1BP1 bestimmen. Somit wird ein Vergleich zwischen RASAL1-Expression in Tumor- und Normalgewebe unter Einsatz der relativen Expression ermöglicht.

### 3.3.3.3 Primer für RT-qPCR

Primernamen	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)	Schmelzpunkte der Primer (° C)	Annealing-Temperatur (° C)	Länge PCR-Produkt (bp)
<b>RASAL1 qPCR F2</b>	GAC GAG GTG GTG GCC AGG ACA G	22	70	65	50
<b>RASAL1 qPCR R2</b>	AAG GGG CCC AGG CTC CTC CAG	21	69		

Tabelle 3.17: Primer für RT-qPCR von RASAL1

### 3.3.4 CIMP-Panel

Zum Vergleich der untersuchten molekularen Marker mit dem CIM-Phänotyp wurden vier Marker aus dem CIMP-Panel nach Weisenberger et al. verwendet, nämlich RUNX3, SOCS1, IGF2 und NEUROG1, ergänzt durch CDKN2A (p16). Mit Hilfe dieses Panels wurden die Tumoren als CIMP-positiv eingestuft, wenn mindestens drei von fünf untersuchten Loci eine Promotorhypermethylierung aufwiesen. Als methyliert wurde jene Gene gewertet, die eine Methylierung von mindestens fünf Prozent aufwiesen. In der Literatur sind Grenzwerte zwischen vier und 10 Prozent üblich. Im verwendeten Markerpanel und unter Einsatz der MethyQESD ergab sich bei dieser Schwelle die beste Korrelation der genannten CIMP-Marker.

### 3.3.5 Statistische Datenauswertung und -analyse

Die klinischen und molekularen Daten wurden mit der Software SPSS 17.0 bzw. PASW Statistics 20.0 für Windows ausgewertet. Das Überleben wurde durch Kaplan-Meier-Kurven dargestellt, wobei die Gleichverteilung dieser Kurven durch den Log-Rank-Test überprüft wurde. Zur Untersuchung zweier nominaler Variablen auf Abhängigkeit fand der exakte Test nach Fisher Verwendung. Für die genannten Untersuchungen wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt.

## 4 Ergebnisse

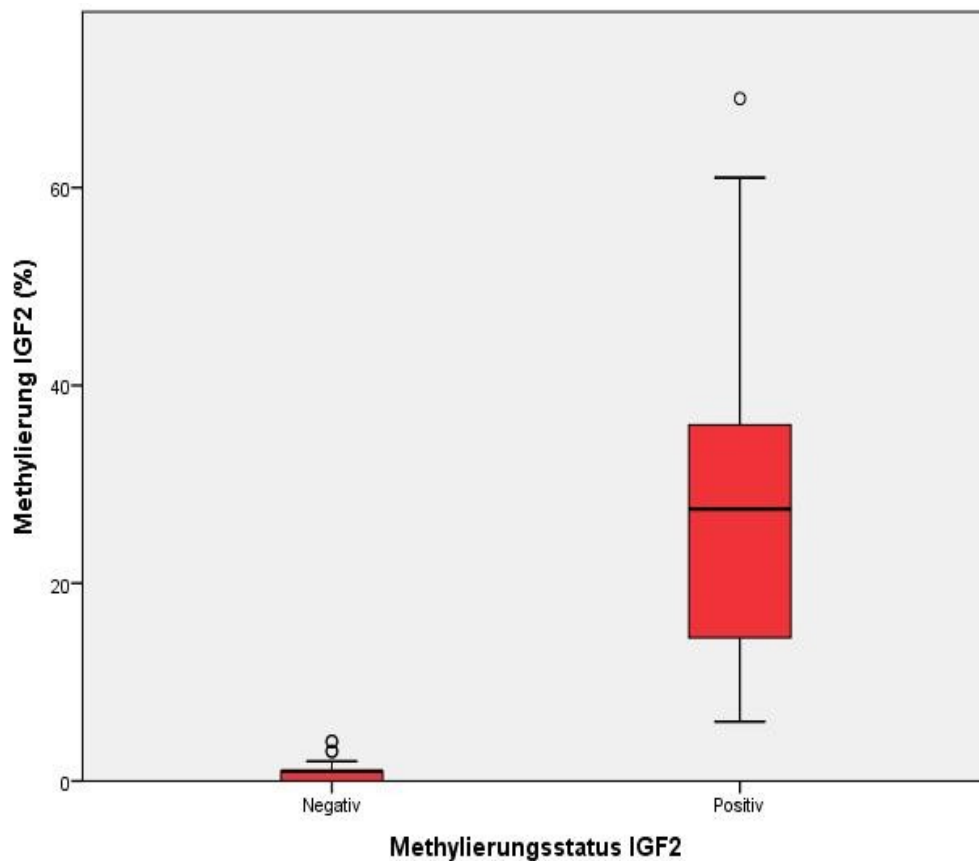
### 4.1 Methylierungsanalyse von IGF2

Mit Hilfe der MethyQESD wurde die Promotormethylierung an den zwischen dem Primerpaar liegenden CpG-Dinukleotiden prozentual bestimmt. MethyQESD bot hierfür einen robusten und schnellen Weg der Methylierungsanalyse. Wie unter 3.3.2 beschrieben ergab sich der Grad der Methylierung aus der Differenz der  $C_t$ -Werte für Quantifikator- und Kalibratoransatz unter Verwendung der PCR-Effizienz. Diese wurde anhand einer Standardkurve bestimmt. Zur Negativkontrolle wurde aus Blut von gesunden Probanden gewonnene DNA, zur Positivkontrolle die KRK-Zelllinie SW48 verwendet.

Die Werte für die Methylierung bewegten sich zwischen 0 und 69 Prozent für die Patientenproben. Als Negativkontrolle kam Blut-DNA zum Einsatz, SW48-DNA wurde als Positivkontrolle verwendet. Im Mittel erreichten die Patientenproben 7,2 % Methylierung (Median 1,0; Standardabweichung 14,0). Es erfolgte eine Unterteilung der untersuchten Materialien in positiven und negativen IGF2-Methylierungsstatus. Als Grenze wurde hierfür, wie unter 3.3.4 beschrieben, ein Grad der Methylierung von 5 % gewählt: Alle Probanden mit mehr als 5 % CpG-Methylierung am untersuchten Bereich des IGF2-Promotors wurden als positiv klassifiziert, alle mit bis zu 5 % als negativ. Bei insgesamt 155 verwertbaren Untersuchten ergab sich diese Verteilung:

	<b>Methylierungspositiv</b>	<b>Methylierungsnegativ</b>
<b>Patientenzahl</b>	n=36 (23 %)	n=119 (77 %)
<b>Prozentuale Methylierung</b>	6 – 69 %	0 – 4 %
<b>Median</b>	28 %	1 %

*Tabelle 4.1: Methylierungsstatus von IGF2 im Tumor in Prozent. Ein überwiegender Teil der Fälle ist nicht methyliert, die methylierten Tumoren weisen eine prozentuale Methylierung von 6 – 69 % auf.*



*Abbildung 4.1: Verteilung der Werte innerhalb der methylierungsnegativen und -positiven Gruppe von IGF2. Beim gewählten Grenzwert liegt der Median der nicht Methylierten bei 1 %, der Median der Methylierten beträgt 28 %.*

Tabelle 4.3 zeigt eine Aufstellung über den Zusammenhang des dichotomen IGF2-Methylierungsstatus mit histopathologischen und molekularen Parametern. Die molekularen Daten lagen zum Zeitpunkt der Analyse bereits vor und konnten für die vergleichende Statistik verwendet werden.

Parameter	Anzahl n (n <sub>gesamt</sub> =155)	IGF2 methyliert	IGF2 nicht methyliert	p
<b>Geschlecht</b>	n=155			
männlich	79	17/79 (22 %)	62 (78 %)	0,704
weiblich	76	19/76 (25 %)	57/76 (75 %)	
<b>Alter</b>	n=155			
< 70	93	19/93 (20 %)	74/93 (80 %)	0,484
> 70	62	17/62 (27 %)	45/62 (73 %)	
<b>T-Status</b>	n=155			
pT1	2	0/2 (0 %)	2/2 (100 %)	0,723
pT2	16	2/16 (12,5 %)	14 (87,5 %)	
pT3	95	23/95 (24 %)	72 (76 %)	
pT4	42	11/42 (26 %)	31 (74 %)	
<b>Grading</b>	n=155			
G0	0	0/0 (0 %)	0/0 (0 %)	0,002*
G1	0	0/0 (0 %)	0/0 (0 %)	
G2	96	14/96 (15 %)	82/96 (85 %)	
G3	59	22/59 (37 %)	37/59 (63 %)	
<b>BRAF**</b>	n=132			
Wildtyp	124	27/124 (22 %)	97 (78 %)	<0,001*
Mutiert	8	7/8 (87,5 %)	1/8 (12,5 %)	
<b>KRAS**</b>	n=152			
Wildtyp	103	24/103 (23 %)	79/103 (77 %)	1,000
Mutiert	49	12/49 (24 %)	37/49 (76 %)	
<b>P53 IHC**</b>	n=148			
< 66 %	72	24/72 (33 %)	48/72 (67 %)	0,011*
> 66 %	76	11/76 (14 %)	65/76 (86 %)	
<b>CIN LOH**</b>	n=154			
>33 %	81	9/81 (11 %)	72/81 (89 %)	

Parameter	Anzahl n (n <sub>gesamt</sub> =155)	IGF2 methyliert	IGF2 nicht methyliert	p
< 33 %	73	27/73 (37 %)	46/73 (63 %)	<0,001*
<b>MSI-Status**</b>	n=148			
MSS	132	23/132 (17 %)	109/132 (83 %)	<0,001*
MSI	16	12/16 (75 %)	4/16 (25 %)	
<b>MASPIN Kernfärbung**</b>	n=145			
Positiv	80	24/80 (30 %)	56/80 (70 %)	0,028*
Negativ	65	9/65 (14 %)	56/65 (86 %)	

*Tabelle 4.2: Korrelation des IGF2-Methylierungsstatus mit histopathologischen und molekularen Parametern.*

*\* signifikante Korrelationen ( $p < 0,05$ )*

*\*\* es lagen nicht zu allen Tumoren vollständige Daten der genannten Marker vor*

Somit besteht eine signifikante Korrelation von IGF2-Methylierungsstatus zu Grading, BRAF-Mutationsstatus, P53-Expression, CIN, MSI und Maspin-Expression. Die IGF2-Methylierung tritt gehäuft bei gering differenzierten, BRAF-mutierten, Mikrosatelliten-instabilen Tumoren auf. Zudem sind IGF2-methylierte Tumoren im Vergleich häufiger an P53 nicht mutiert und weisen keine chromosomale Instabilität auf. Jedoch besteht kein signifikanter Zusammenhang zum KRAS-Mutationsstatus sowie zu Alter, Geschlecht und den anderen genannten histopathologischen Grundcharakteristika.

Es sollte weiterhin untersucht werden, ob sich ein möglicher Einfluss des IGF2-Methylierungsstatus auf das Gesamtüberleben bemerkbar macht:

	Überleben aller Patienten in Monaten (95 %-Konfidenzintervall)	Überleben Patienten mit 5-FU-Chemotherapie in Monaten (95 %-Konfidenzintervall)	Überleben Patienten ohne 5-FU-Chemotherapie in Monaten (95 %-Konfidenzintervall)	p-Wert
<b>IGF2-positiv</b>	79,8 (63,2 – 96,4)	91,6 (71,3 – 111,9)	53,5 (34,5 – 72,5)	0,081
<b>IGF2-negativ</b>	86,5 (76,8 – 96,1)	91,9 (80,0 – 103,7)	76,4 (61,3 – 91,5)	0,082
<b>p-Wert</b>	0,724	0,825	0,433	

*Tabelle 4.3: Mittleres Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit vom IGF2-Status. Sowohl bei methylierten als auch nicht methylierten Fällen ergibt sich ein nicht signifikanter Überlebensvorteil durch 5-FU-Chemotherapie*

Somit zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen IGF2-Methylierungsstatus und dem Gesamtüberleben. Sowohl Patienten mit nicht methylierten als auch Patienten mit methylierten Tumoren profitieren von 5-FU-basierter Systemtherapie ohne statistische Signifikanz. Letztere haben allerdings ohne Chemotherapie eine schlechtere Prognose.

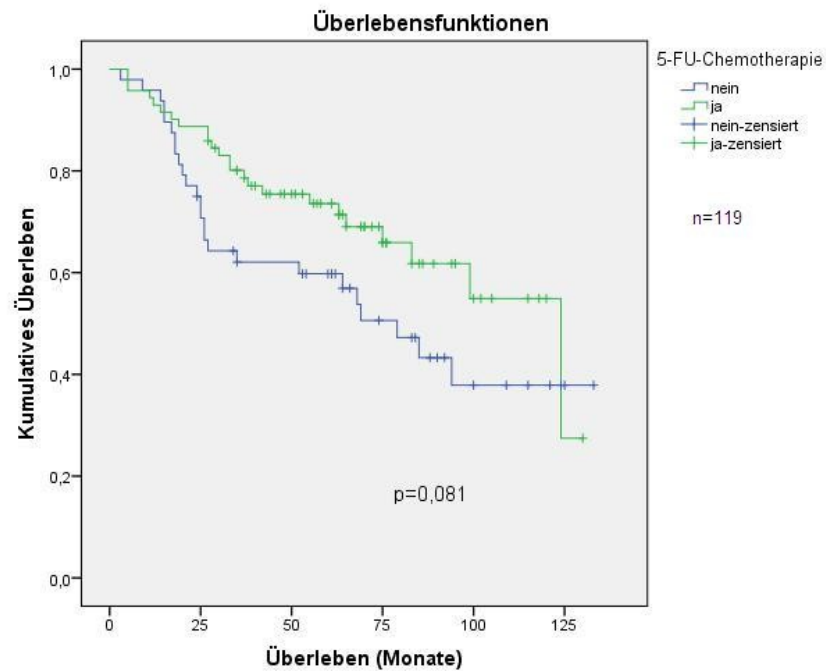


Abbildung 4.2: Gesamtüberleben von IGF2-methylierungsnegativen Patienten. Die Patienten mit nicht methylierten Tumoren profitieren von einer 5-FU-basierten Chemotherapie, jedoch ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang ( $p=0.081$ ).

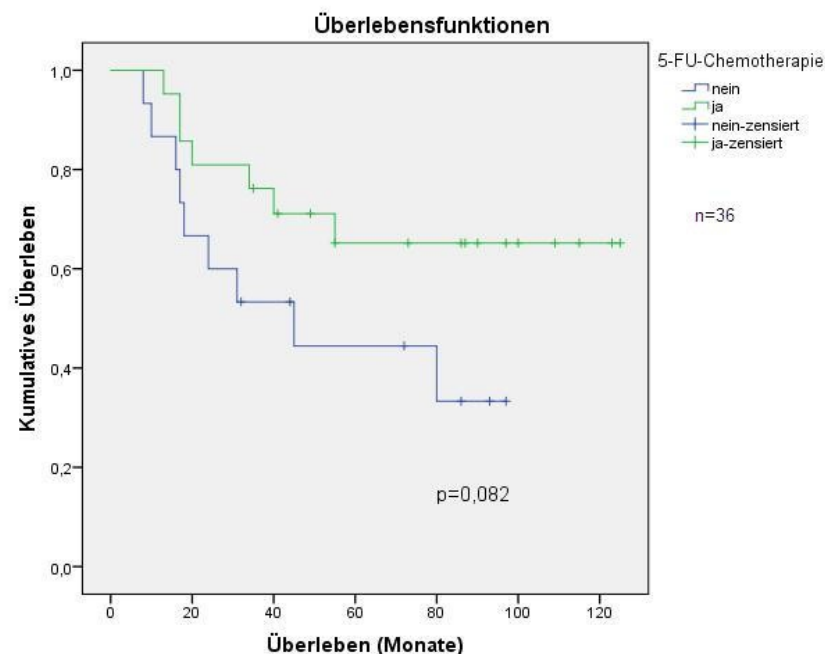


Abbildung 4.3: Gesamtüberleben von IGF2-methylierungspositiven Patienten. Die Patienten mit methylierten Tumoren profitieren ebenso von einer 5-FU-basierten Chemotherapie, jedoch ergibt sich kein signifikanter Zusammenhang ( $p=0.082$ ).

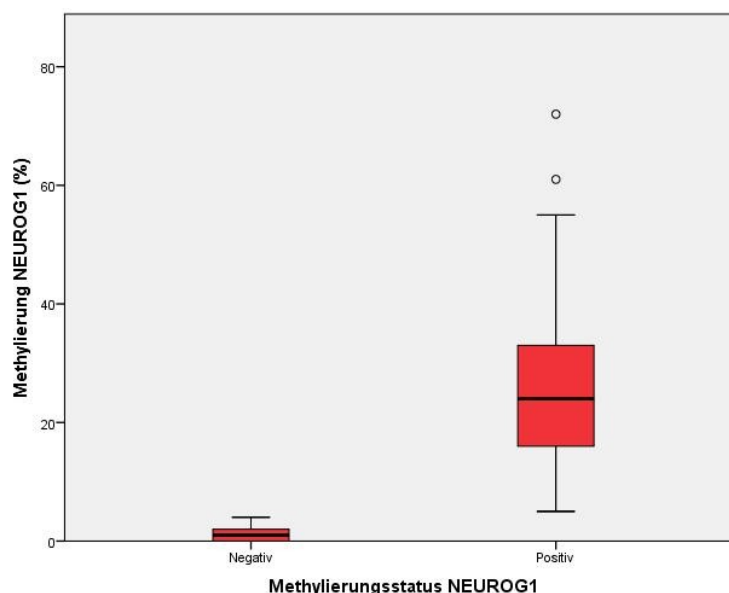


## 4.2 Methylierungsanalyse von NEUROG1

Analog zu IGF2 wurde der Methylierungsgrad auch beim zweiten CIMP-Marker NEUROG1 bestimmt. Der so untersuchte Neurogenin1-Promotor zeigte im Tumorgewebe der Patienten eine prozentuale Methylierung von minimal 0 bis maximal 72 %. Als Negativkontrolle kam Blut-DNA zum Einsatz, SW48-DNA wurde als Positivkontrolle verwendet. In den Patientenproben lag eine mittlere Methylierung von 12,4 % bzw. ein Median von 3,0 % vor (Standardabweichung 16,0). Als Grenzwert für die Unterscheidung in Methylierungspositive und -negative bzgl. der NEUROG1-Promotor-Methylierung wurde ein Wert von 5 % gewählt. Dadurch kam es bei einer Gesamtzahl von 156 auswertbaren Ergebnissen zu folgender Verteilung:

	Methylierungspositiv	Methylierungsnegativ
<b>Patientenzahl</b>	n=69 (44 %)	n=87 (56 %)
<b>Prozentuale Methylierung</b>	6 – 72 %	0 – 4 %
<b>Median</b>	24 %	1 %

*Tabelle 4.4: Methylierungsstatus von NEUROG1 im Tumor in Prozent. Es finden sich mehr methylierungsnegative als -positive Fälle, die methylierten Tumoren weisen eine prozentuale Methylierung von 6 – 72 % auf.*



*Abbildung 4.4: Verteilung der Werte innerhalb der negativen und positiven Gruppe von NEUROG1. Beim gewählten Grenzwert liegt der Median der nicht Methylierten bei 1 %, der Median der Methylierten beträgt 24 %.*

Parameter	Anzahl n (n <sub>gesamt</sub> = 156)	NEUROG1 methyliert	NEUROG1 nicht methyliert	p
<b>Geschlecht</b>	n=156			
männlich	79	36/79 (46 %)	43/79 (54 %)	0,750
weiblich	77	33/77 (43 %)	44/77 (57 %)	
<b>Alter</b>	n=156			
< 70	94	41/94 (44 %)	53/94 (56 %)	0,463
> 70	62	28/62 (45 %)	34/62 (55 %)	
<b>T-Status</b>	n=156			
pT1	2	0/2 (0 %)	2/2 (100 %)	0,806
pT2	16	7/16 (44 %)	9/16 (56 %)	
pT3	96	43/96 (45 %)	53/96 (55 %)	
pT4	42	19/42 (45 %)	23/42 (55 %)	
<b>Grading</b>	n=156			
G0	0	0/0 (0 %)	0/0 (0 %)	0,020*
G1	0	0/0 (0 %)	0/0 (0 %)	
G2	96	35/96 (36 %)	61/96 (64 %)	
G3	60	34/60 (57 %)	26/60 (43 %)	
<b>BRAF**</b>	n=133			
Wildtyp	125	55/125 (44 %)	70/125 (56 %)	0,025*
Mutiert	8	7 (87,5 %)	1 (12,5 %)	
<b>KRAS**</b>	n=153			
Wildtyp	103	39/103 (38 %)	64/103 (62 %)	0,023*
Mutiert	50	30/50 (60 %)	20/50 (40 %)	
<b>P53 IHC**</b>	n=149			
< 66 %	72	39/72 (54 %)	33 /72 (46 %)	0,019*
> 66 %	77	27/77 (35 %)	50/77 (65 %)	
<b>CIN LOH**</b>	n=155			
> 33 %	81	29/81 (36 %)	52/81 (64 %)	

Parameter	Anzahl n (n <sub>gesamt</sub> = 156)	NEUROG1 methyliert	NEUROG1 nicht methyliert	p
< 33 %	74	39/74 (53 %)	35/74 (47 %)	0,037*
<b>MSI-Status**</b>	n=154			
MSS	136	57/136 (42 %)	79/136 (58 %)	0,075
MSI	18	12/18 (67 %)	6/18 (33 %)	
<b>MSPIN Kernfärbung**</b>	n=146			
Positiv	80	39/80 (49 %)	41/80 (51 %)	0,241
Negativ	66	25/66 (38 %)	41/66 (62 %)	

*Tabelle 4.5: Korrelation des NEUROG1-Methylierungsstatus mit histopathologischen und molekularen Parametern.*

*\* signifikante Korrelationen ( $p < 0,05$ )*

*\*\* es lagen nicht zu allen Tumoren vollständige Daten der genannten Marker vor*

In diesen Analysen finden sich signifikante Korrelationen von NEUROG1 mit dem Grading, dem BRAF- und KRAS-Mutationsstatus, P53-Expression und CIN. Bei den methylierten Tumoren ist die Rate gering- und mittelgradiger Differenzierung vergleichbar. Betrachtet man jedoch die nicht methylierten Fälle, so wurde eine überwiegende Zahl als G2 eingestuft (Verhältnis 35 zu 34 vs. 61 zu 26). Ähnlich verhält sich die Korrelation zwischen KRAS-Mutation und NEUROG1-Methylierung mit einer signifikanten Assoziation von KRAS-Wildtyp und negativem Methylierungsstatus ( $p=0,023$ ). Dieser ist zudem mit P53-Mutation ( $p=0,019$ ) und CIN ( $p=0,037$ ) signifikant verknüpft. Sieben von acht (87,5 %) BRAF-mutierten Fällen sind zugleich an NEUROG1 methyliert. Außerdem besteht ein Trend zur Assoziation von NEUROG1-methylierungspositiven Fällen und Mikrosatelliteninstabilität ( $p=0,075$ ).

Der Einfluss des NEUROG1-Status auf das Gesamtüberleben wird in Tabelle 4.6 dargestellt:

	NEUROG1 methyliert	NEUROG1 nicht methyliert	p-Wert
Überleben alle Patienten in Monaten (95 %- Konfidenzintervall)	78,0 (65,8 – 90,3)	88,3 (77,4 – 99,2)	0,382
Überleben Patienten mit 5-FU- Chemotherapie in Monaten (95 %- Konfidenzintervall)	97,8 (82,5 – 113,1)	86,6 (73,8 – 100,0)	0,222
Überleben Patienten ohne 5-FU- Chemotherapie in Monaten (95 %- Konfidenzintervall)	58,6 (42,3 – 74,9)	90,1 (71,7 – 108,6)	0,032
p-Wert	0,002	0,918	

*Tabelle 4.6: Mittleres Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit vom NEUROG1-Promotormethylierungsstatus. NEUROG1-methylierte Fälle profitieren signifikant von 5-FU-basierter Chemotherapie, nicht methylierte Fälle hingegen nicht.*

Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6 vergleichen das Gesamtüberleben von NEUROG1-Negativen und -Positiven in Abhängigkeit vom Erhalt einer 5-FU-Chemotherapie. Bei Negativen hat die zytostatische Therapie keine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens zur Folge ( $p=0,918$ ), wohingegen die NEUROG1-Methylierungspositiven von einer Chemotherapie profitieren ( $p=0,003$ ).

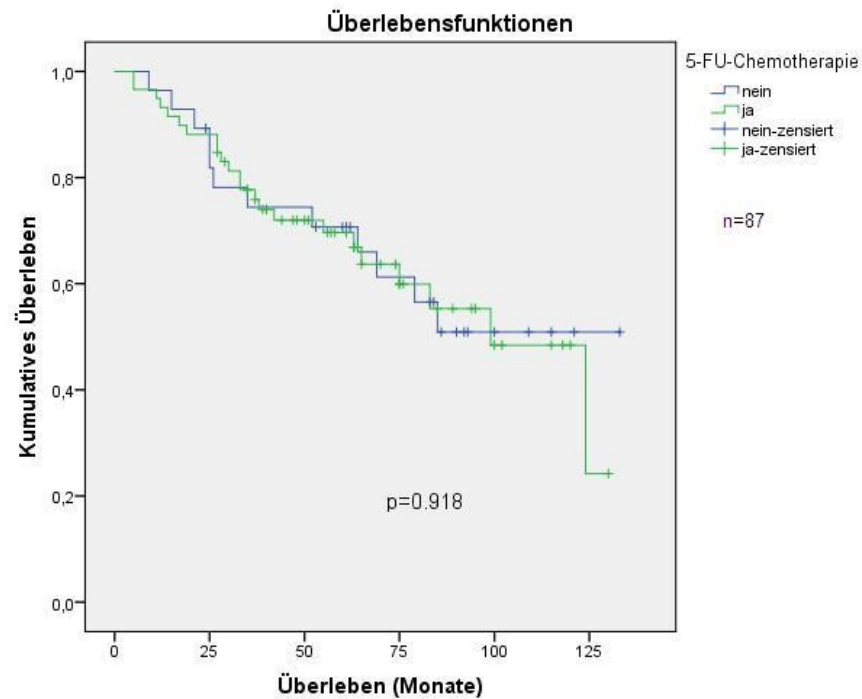


Abbildung 4.5: Gesamtüberleben der NEUROG1-Negativen. Kein eindeutiger Überlebensvorteil durch 5-FU-Chemotherapie ( $p=0,918$ )

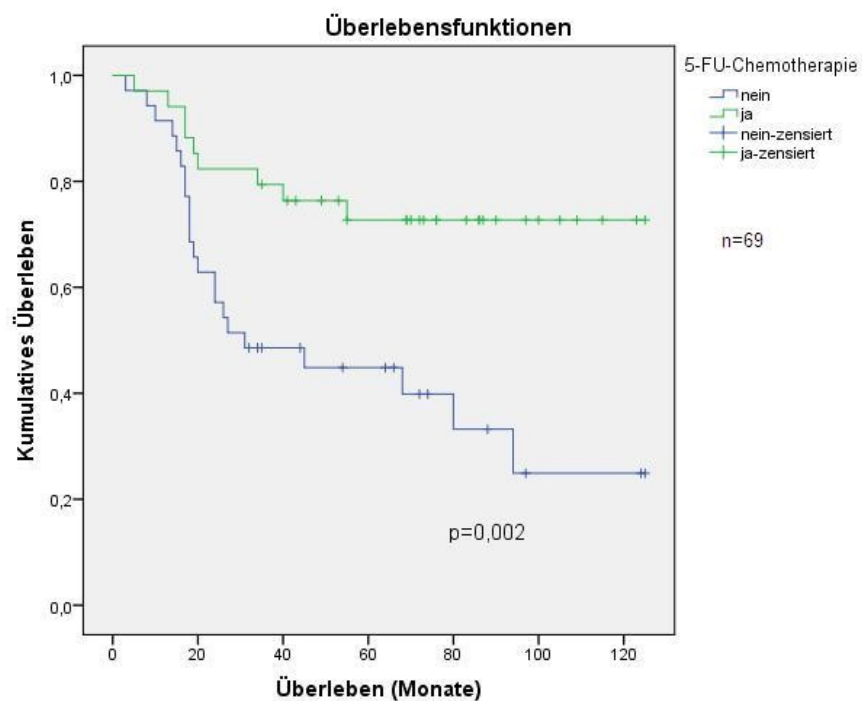
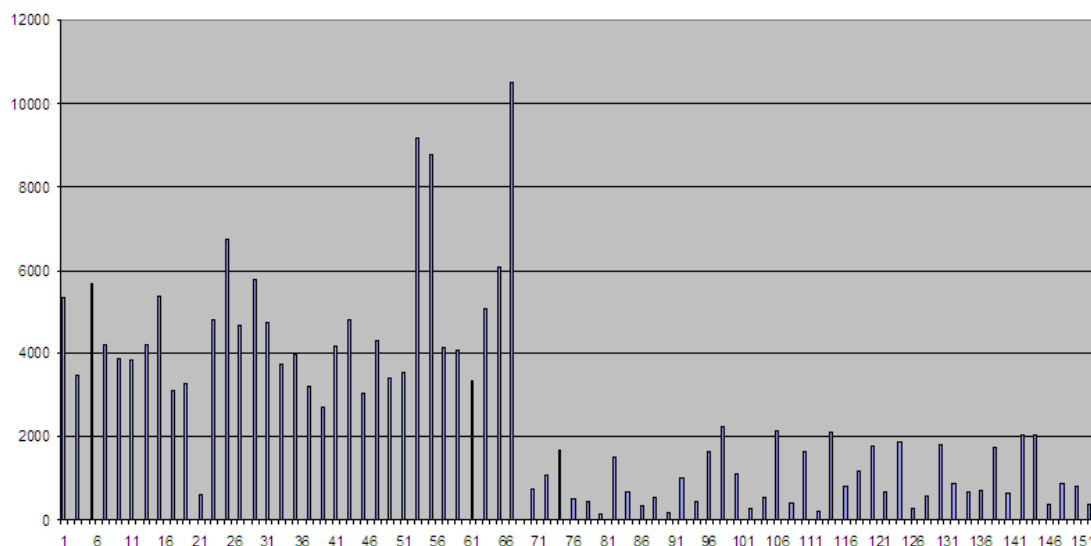


Abbildung 4.6: Gesamtüberleben der NEUROG1-Positiven. Signifikanter Überlebensvorteil durch 5-FU-Chemotherapie ( $p=0,002$ )

### 4.3 Ergebnisse PRKACB

In der Affymetrix-Untersuchung zeigte sich folgende Expression im Vergleich zwischen Normal- und Tumorgewebe:

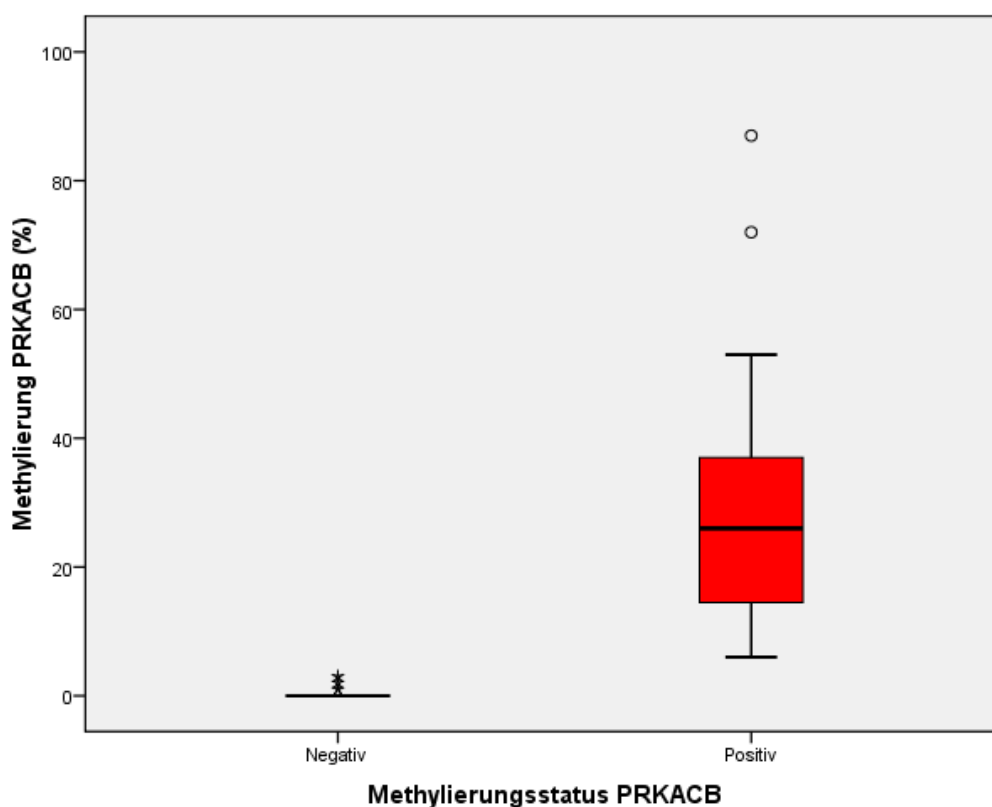


*Abbildung 4.7: Affymetrix-Untersuchung für PRKACB. 1 bis 66 zeigt die mRNA-Expression im Normalgewebe, 67 bis 154 im Tumorgewebe*

Beim Patientenkollektiv B wurde die Promotormethylierung von PRKACB mit Hilfe von MethyQESD analysiert, um deren Eignung als prognostischer und prädiktiver Parameter zu prüfen. Der Grad der Methylierung bewegte sich bei den Patientenproben im Rahmen von 0 bis 72 %. Als Negativkontrolle kam Blut-DNA zum Einsatz, SW48-DNA wurde als Positivkontrolle verwendet. Im untersuchten Kollektiv lag eine mittlere Methylierung von 5,2 % (Median 0 %, Standardabweichung 14,1) vor. Die Grenze zwischen negativem und positivem Methylierungsstatus wurde bei 5 % gesetzt, wodurch sich bei einer Gesamtzahl von 136 verwertbaren Ergebnissen 23 positive und 113 negative Einstufungen ergaben.

	Methylierungspositiv	Methylierungsnegativ
<b>Patientenzahl</b>	n=23 (17 %)	n=113 (83 %)
<b>Prozentuale Methylierung</b>	6 – 87 %	0 – 3 %
<b>Median</b>	26 %	0 %

*Tabelle 4.7: Methylierungsstatus von PRKACB im Tumor in Prozent. Ein überwiegender Teil der Fälle zeigt sich nicht methyliert, die methylierten Tumoren weisen eine prozentuale Methylierung von 6 – 87 % auf.*



*Abbildung 4.8: Verteilung der Werte innerhalb der negativen und positiven Gruppe von PRKACB. Beim gewählten Grenzwert liegt der Median der nicht methylierten Fälle bei 0 %. Der Median der Methylierten beträgt 26 %.*

Im Folgenden soll die Korrelation des Methylierungsstatus mit histopathologischen Kenngrößen gezeigt werden:

Parameter	Anzahl n (n <sub>gesamt</sub> = 136)	PRKACB methyliert	PRKACB nicht methyliert	p
<b>Geschlecht</b>	n=136			
männlich	69	11/69 (16 %)	58/69 (84 %)	0,821
weiblich	67	12/67 (18 %)	55/67 (82 %)	
<b>Alter</b>	n=136			
< 70	80	11/80 (14 %)	69/80 (86 %)	0,438
> 70	56	12/56 (21 %)	44/56 (79 %)	
<b>T-Status</b>	n=136			
pT1	2	0/2 (0 %)	2/2 (100 %)	0,847
pT2	13	1/13 (8 %)	12/13 (92 %)	
pT3	86	16/86 (19 %)	70/86 (81 %)	
pT4	35	6/35 (17 %)	29/35 (83 %)	
<b>Grading</b>	n=136			
G0	0	0/0 (0 %)	0/0 (0 %)	0,017*
G1	0	0/0 (0 %)	0/0 (0 %)	
G2	85	9/85 (11 %)	76/85 (89 %)	
G3	51	14/51 (27 %)	37/51 (73 %)	
<b>BRAF**</b>	n=122			
Wildtyp	114	17/114 (15 %)	97/114 (85 %)	0,005*
Mutiert	8	5/8 (62,5 %)	3/8 (37,5 %)	
<b>KRAS**</b>	n=135			
Wildtyp	90	17/90 (19 %)	73/90 (81 %)	0,476
Mutiert	45	6/45 (13 %)	39/45 (87 %)	
<b>P53 IHC**</b>	n=132			
< 66 %	65	15/65 (23 %)	50/65 (77 %)	0,063
> 66 %	67	7/67 (10 %)	60/67 (90 %)	
<b>CIN LOH**</b>	n=136			
>33 %	71	6/71 (8 %)	65/71 (92 %)	



Parameter	Anzahl n (n <sub>gesamt</sub> = 136)	PRKACB methyliert	PRKACB nicht methyliert	p
< 33 %	64	17/64 (27 %)	47/64 (73 %)	0,006*
<b>MSI-Status**</b>	n=130			
MSS	116	16/116 (14 %)	100/116 (86 %)	0,014*
MSI	14	6/14 (43 %)	8/14 (57 %)	
<b>MASPIN Kernfärbung**</b>	n=127			
Positiv	67	17/67 (25 %)	50/67 (75 %)	0,018*
Negativ	60	5/60 (8 %)	55/60 (92 %)	

*Tabelle 4.8: Korrelation des PRKACB-Methylierungsstatus mit histopathologischen und molekularen Parametern.*

\* *signifikante Korrelationen ( $p < 0,05$ )*

\*\* *es lagen nicht zu allen Tumoren vollständige Daten der genannten Marker vor*

Es ergibt sich eine signifikante Korrelation von PRKACB-Methylierungsstatus mit Grading, BRAF-Mutationsstatus, CIN, MSI und MASPIN-Expression. Auch bei diesem Marker findet sich mit 27 vs. 11 % ein höherer Anteil an Methylierten in der Gruppe der gering differenzierten Tumoren. Darüber hinaus sind fünf von acht BRAF-mutierten Fällen an PRKACB methyliert, im Falle eines BRAF-Wildtyp-Status sind es jedoch nur 17 von 144. Eine vergleichbare Assoziation zeigen PRKACB-Methylierung und Mikrosatelliteninstabilität mit sechs von acht vs. 16 von 100 Fällen. Des Weiteren findet sich gehäuft eine chromosomale Instabilität in der Gruppe der methylierungsnegativen Gewebe.

Darüber hinaus wurde die Korrelation des PRKACB-Methylierungsstatus mit dem CIMP-Status untersucht. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden genannten Parametern. In 122 von 136 Fällen ist der Methylierungsstatus an PRKACB und für das untersuchte CIMP-Panel gleich.

	<b>CIMP+</b>	<b>CIMP-</b>	<b>p</b>
<b>PRKACB-positiv</b>	20	3	< 0,001
<b>PRKACB-negativ</b>	11	102	

*Tabelle 4.9: Signifikante Korrelation des PRKACB-Methylierungsstatus mit dem CIMP-Status*

In Tabelle 4.10 wird das Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom PRKACB-Status dargestellt:

	<b>PRKACB methyliert</b>	<b>PRKACB nicht methyliert</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Überleben alle Patienten in Monaten (95 %-Konfidenzintervall)</b>	76,7 (55,8 – 97,6)	88,1 (78,1 – 98,2)	0,512
<b>Überleben Patienten mit 5-FU- Chemotherapie in Monaten (95 %- Konfidenzintervall)</b>	88,9 (65,7 – 112,0)	94,9 (82,4 – 107,5)	0,803
<b>Überleben Patienten ohne 5-FU- Chemotherapie in Monaten (95 %- Konfidenzintervall)</b>	40,7 (14,0 – 67,4)	76,3 (61,0 – 91,6)	0,166
<b>p-Wert</b>	0,061	0,037	

*Tabelle 4.10: Mittleres Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit vom PRKACB-Promotormethylierungsstatus. Nicht methylierte Fälle profitieren signifikant von 5-FU-basierter Chemotherapie, methylierte Fälle zeigen einen dahingehenden Trend ohne statistische Signifikanz.*

Es lässt sich feststellen, dass Methylierungsnegative in diesem Kollektiv ein höheres mittleres Gesamtüberleben aufweisen, siehe auch Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10. Nicht methylierte Fälle profitieren signifikant von 5-FU-Chemotherapie, bei den methylierten Fällen besteht lediglich ein dahingehender Trend ohne statistische Signifikanz bei allerdings geringer Zahl Methylierungspositiver.

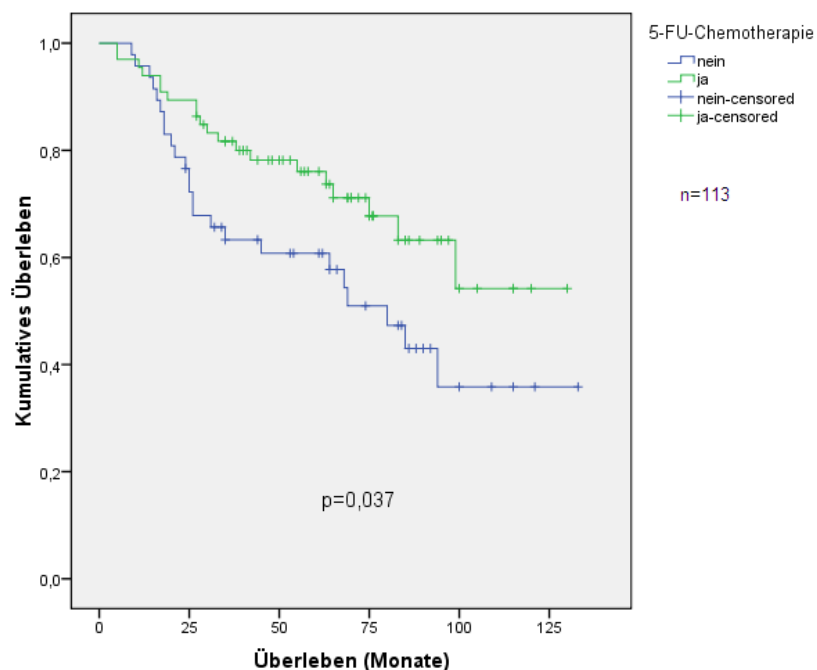


Abbildung 4.9: Gesamtüberleben von PRKACB-methylierungsnegativen Patienten. Es besteht ein signifikanter Überlebensvorteil durch 5-FU-Chemotherapie

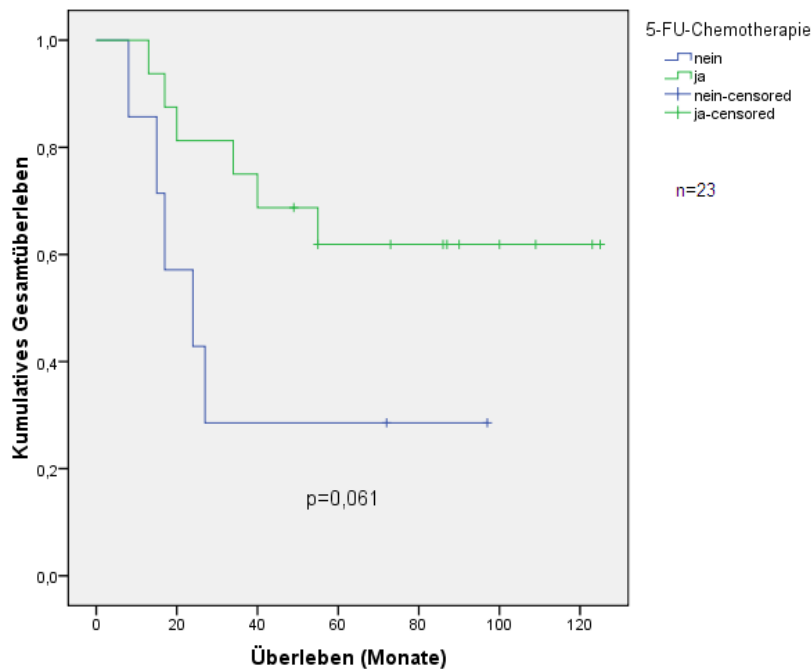


Abbildung 4.10: Gesamtüberleben von PRKACB-methylierungspositiven Patienten. Es zeigt sich ein Trend zum Überlebensvorteil durch 5-FU-Chemotherapie ohne Signifikanz, dies allerdings bei niedriger Zahl methylierter Fälle im Kollektiv.

## 4.4 Ergebnisse RASAL1

### 4.4.1 Methylierungsanalyse

Das für RASAL1 kodierende Gen wurde mit Hilfe der MethyQESD bezüglich seiner Promotormethylierung untersucht. Hier zeigte sich für Blut-DNA und für die KRK-Zelllinien-DNA SW48 sowie SW480 eine Methylierung von jeweils 0 %. Hierin unterscheidet es sich von den anderen untersuchten Markern, die jeweils in den genannten KRK-Zelllinien einen stets positiven Methylierungsstatus aufwiesen. Für das Patientenkollektiv lagen die Werte im Tumor zwischen einem Minimum von 0 und einem Maximum von 30 %. Der Mittelwert betrug 0,67 %, der Median 0 %. Analog zu den übrigen Markern wurde ab einer Grenze von 5 % der Methylierungsstatus als positiv eingestuft. Es zeigte sich eine niedrige Frequenz von Promotormethylierungen. Deshalb wurden dem Kollektiv B für die Untersuchung von RASAL1 zusätzlich 51 Patienten hinzugefügt, um den Einfluss von Störgrößen zu minimieren und gesicherte statistische Aussagen treffen zu können. Somit ergab sich eine Gesamtzahl von 207 untersuchten Fällen, deren Methylierungswerte sich wie folgt verteilen:

	<b>Methylierungspositiv</b>	<b>Methylierungsnegativ</b>
<b>Patientenzahl</b>	n=6 (3 %)	n=201 (97 %)
<b>Prozentuale Methylierung</b>	7-30 %	0 – 4 %
<b>Median</b>	13 %	0 %

*Tabelle 4.11: Methylierungsstatus von RASAL1 im Tumor in Prozent. Es finden sich überwiegend methylierungsnegative Fälle, die methylierten Tumoren weisen eine prozentuale Methylierung von 7 – 30 % auf.*

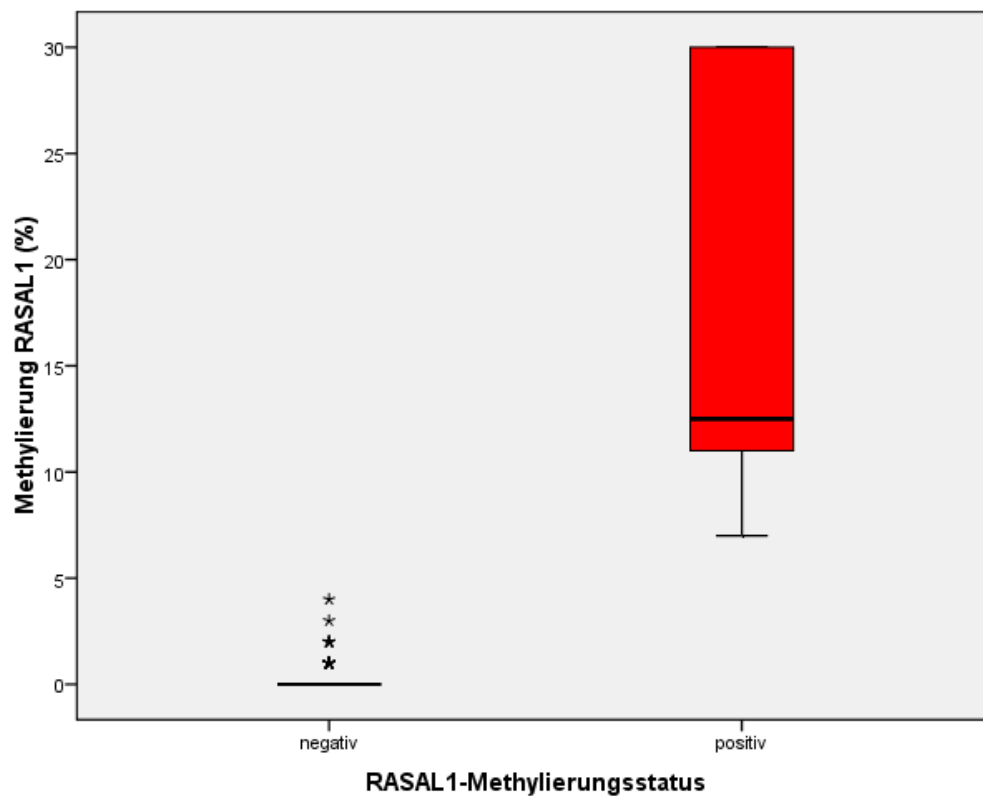


Abbildung 4.11: Verteilung der Werte innerhalb der negativen und positiven Gruppe von RASAL1. Beim gewählten Grenzwert liegt der Median der nicht methylierten Fälle bei 0 %. Der Median der Methylierten beträgt 13 %.

Für die positiven Fälle ergeben sich folgende Werte:

Fall	Methylierung in Prozent
1	12
2	30
3	11
4	7
5	13
6	30

Tabelle 4.12: prozentuale Methylierung der positiven Fälle

Tabelle 4.13 zeigt die Korrelation des RASAL1-Methylierungsstatus mit histo- und molekularpathologischen Größen:

Parameter	Anzahl n (n <sub>gesamt</sub> = 207)	RASAL1 methyliert	RASAL1 nicht methyliert	p
<b>Geschlecht</b>	n=207			
männlich	110	3/110 (3 %)	107/110 (97 %)	0,876
weiblich	97	3/97 (3 %)	94/97 (97 %)	
<b>Alter</b>	n=207			
< 70	129	5/129 (4 %)	124/129 (96 %)	0,533
> 70	78	1/78 (1 %)	77/78 (99 %)	
<b>T-Status</b>	n=207			
pT1	2	0/2 (0 %)	2/2 (100 %)	0,573
pT2	17	0/17 (0 %)	17/17 (100 %)	
pT3	127	4/127 (3 %)	123/127 (97 %)	
pT4	61	2/61 (3 %)	59/61 (97 %)	
<b>Grading</b>	n=207			
G0	0	0/0 (0 %)	0/0 (0 %)	0,313
G1	1	0/0 (0 %)	1/1 (100 %)	
G2	129	5/129 (4 %)	124 (96 %)	
G3	77	1/77 (1 %)	76/77 (99 %)	
<b>BRAF**</b>	n=134			
Wildtyp	126	3/126 (2 %)	123/126 (98 %)	0,903
Mutiert	8	0/8 (0 %)	8/8 (100 %)	
<b>P53 IHC**</b>	n=150			
< 66 %	73	2/73 (3 %)	71/73 (97 %)	0,957
> 66 %	77	2/77 (3 %)	75/77 (97 %)	
<b>CIN LOH**</b>	n=155			
>33 %	62	2/62 (3 %)	60/62 (97 %)	0,694
< 33 %	93	2/93 (2 %)	91/93 (98 %)	
<b>MSI-Status**</b>	n=154			
MSS	136	4/136 (3 %)	132/136 (97 %)	

Parameter	Anzahl n (n <sub>gesamt</sub> = 207)	RASAL1 methyliert	RASAL1 nicht methyliert	p
MSI	18	1/18 (6 %)	17/18 (94 %)	0,429
<b>MSPIN Kernfärbung**</b>	n=146			
Positiv	81	3/81 (4 %)	78/81 (96 %)	0,429
Negativ	65	1/65 (2 %)	64/65 (98 %)	

*Tabelle 4.13: Korrelation des RASAL1-Methylierungsstatus mit histopathologischen und molekularen Parametern.*

\* signifikante Korrelationen ( $p < 0,05$ )

\*\* es lagen nicht zu allen Tumoren vollständige Daten der genannten Marker vor

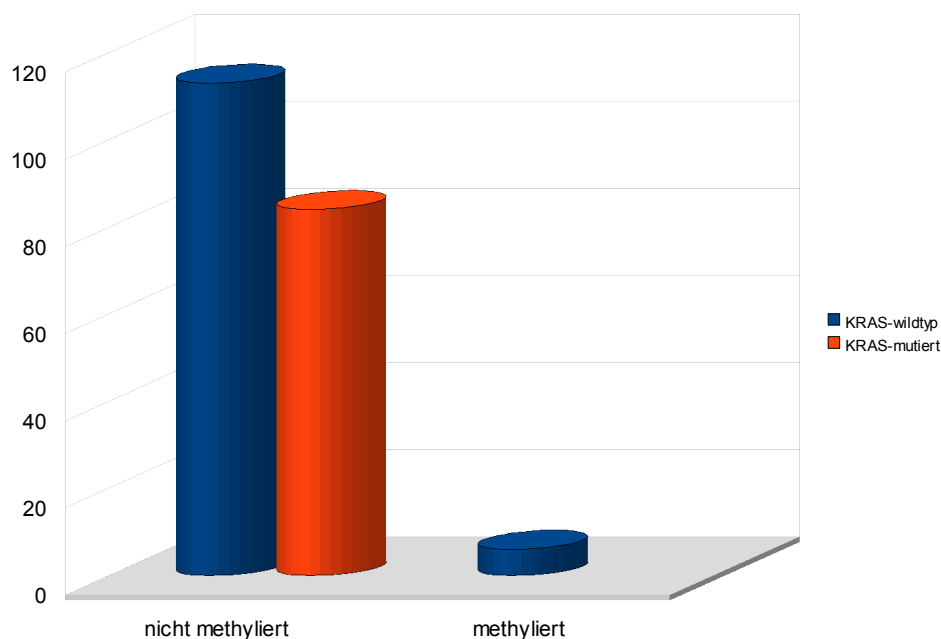
Somit ergaben sich im Gegensatz zu den bisher analysierten Genen keine signifikanten Korrelationen zwischen RASAL1-Methylierungsstatus und den oben genannten Parametern.

Im Fokus stand bei diesem Marker jedoch die Korrelation zwischen dessen Promotormethylierung und dem Auftreten von KRAS-Mutationen, da er in diesem Rahmen als alternativer KRAS-Aktivierungsmechanismus untersucht werden sollte. Es konnte im untersuchten Patientengut die Hypothese bestätigt werden, dass eine RASAL1-Methylierung und KRAS-Mutation sich gegenseitig ausschließen.

	KRAS Wildtyp	KRAS mutiert	p
<b>RASAL1-Methylierungspositiv</b>	6	0	0,043*
<b>RASAL1-Methylierungsnegativ</b>	113	84	

*Tabelle 4.14: Korrelation des RASAL1-Methylierungsstatus mit dem KRAS-Mutationsstatus*

Somit zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen KRAS und RASAL1-Status ( $p = 0,043$ ).



*Abbildung 4.12: KRAS-Mutationsstatus in Abhängigkeit von RASAL1-Methylierung*

Wenn man die signifikante Korrelation mit dem KRAS-Mutationsstatus betrachtet, so erscheint es naheliegend, dass die Promotorhypermethylierung von RASAL1 einen alternativen KRAS-Aktivierungsweg bietet. Um auszuschließen, dass RASAL1 lediglich einen CIMP-Surrogatmarker darstellt, wurde der Zusammenhang zwischen RASAL1 und den CIMP-Tumoren untersucht:

	CIMP+	CIMP-	p
<b>RASAL1-positiv</b>	2	2	0,189
<b>RASAL1-negativ</b>	29	117	

*Tabelle 4.15: Korrelation des RASAL1-Methylierungsstatus mit dem CIMP-Status. Es lagen nicht für alle Patienten Daten zum CIMP-Phänotyp vor, was sich in der geringeren Gesamtfallzahl widerspiegelt.*

Somit konnte – bei allerdings begrenzter Fallzahl – kein signifikanter Zusammenhang zwischen CIMP-positiven und RASAL1-methylierungspositiven Tumoren identifiziert werden. Folglich ist RASAL1 nach den gewonnenen Daten nicht als CIMP-Surrogatparameter einzustufen und unabhängig von CIMP zu betrachten.



Im Folgenden soll die Korrelation zwischen RASAL1-Methylierungsstatus und dem Gesamtüberleben aufgezeigt werden. Für insgesamt 156 Probanden lagen Daten zu beiden Punkten vor, so dass sich folgende Konstellation ergibt:

	<b>RASAL1-positiv</b>	<b>RASAL1-negativ</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Überleben alle Patienten in Monaten (95 %-Konfidenzintervall)</b>	52,6 (27,5 – 77,7)	86,4 (77,7 – 95,1)	0,785

*Tabelle 4.16: Mittleres Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom RASAL1-Methylierungsstatus. Tendenz zum kürzerem Überleben der Patienten mit RASAL1-Methylierung, zu berücksichtigen ist jedoch die geringe Fallzahl an RASAL1-methylierten Tumoren.*

#### 4.4.2 RASAL1-Expressionsanalyse

Nachdem bei 3 % der untersuchten KRK eine Hypermethylierung des RASAL1-Promotors nachgewiesen werden konnte, sollte zudem untersucht werden, ob diese epigenetische Veränderung in Zusammenhang mit einer verminderten mRNA-Expression von RASAL1 steht. Hierfür wurde die mRNA-Expression zum Einen bei den methylierten Fällen, zum Anderen bei der gleichen Anzahl unmethylierter Fälle aus Kollektiv B vergleichend zwischen Tumor- und Normalgewebe analysiert. Nach Isolierung von RNA und deren Nachweis mittels RT-qPCR ergaben sich folgende Werte für die mRNA-Expression:

<b>Fall</b>	<b>Prozentuale Methylierung für RASAL1</b>	<b>Relative Expression RASAL1 Tumorgewebe/ Normalgewebe</b>
<b>1</b>	12	0,05
<b>2</b>	30	0,11
<b>3</b>	11	0,42
<b>4</b>	7	0,08
<b>5</b>	13	0,38
<b>6</b>	30	0,36

*Tabelle 4.17: Relative Expression der für RASAL1 Methylierungspositiven. Bei allen an RASAL1 methylierten Fällen findet sich eine geringere RASAL1-Expression im Tumorgewebe relativ zum Normalgewebe*

Fall	Prozentuale Methylierung für RASAL1	Relative Expression RASAL1 Tumorgewebe/ Normalgewebe
7	0	1,93
8	0	10,48
9	0	1,35
10	0	1,27
11	0	2,62
12	0	0,20

*Tabelle 4.18: Relative Expression von sechs RASAL1-Methylierungsnegativen. In fünf von sechs Fällen ist die RASAL1-Expression im Tumorgewebe höher als im Normalgewebe*

Zusammenfassend ergibt sich bei allen Methylierungspositiven eine reduzierte mRNA-Expression von RASAL1 im Tumorgewebe relativ zum Normalgewebe. Betrachtet man jedoch die Methylierungsnegativen, so zeigt sich lediglich bei einem von sechs Fällen eine verminderte Expression, in den weiteren KRK eine verstärkte RASAL1-Expression im Vergleich zum Normalgewebe. Abbildung 4.13 zeigt die erhaltenen Werte:

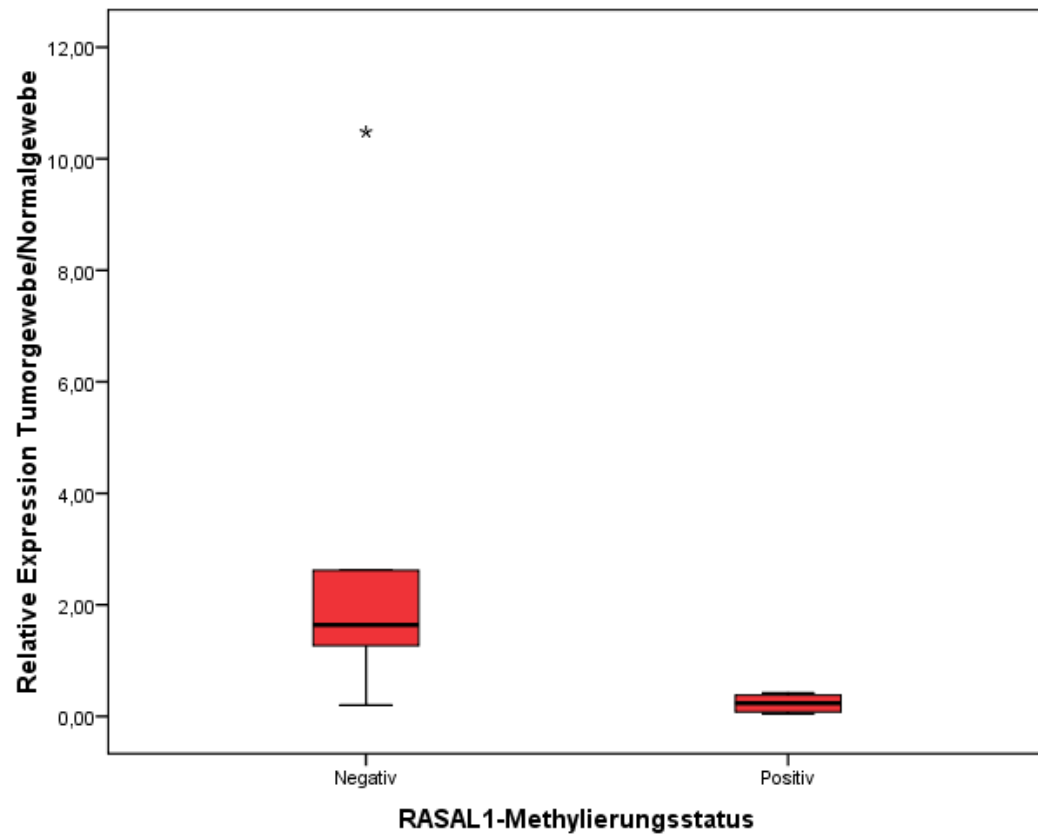


Abbildung 4.13: Relative Expression von *RASAL1* aufgegliedert in methylierungsnegative und -positive Fälle. Die methylierten Tumoren weisen im Verhältnis zum Normalgewebe eine erniedrigte Expression im Tumorgewebe auf als die nicht methylierten.

## 5 Diskussion

In den vergangenen Jahren haben sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der epigenetischen Analyse von kolorektalen Tumoren beschäftigt. Der Fokus lag hierbei auf der Methylierungsanalyse und der Identifikation von Tumorsuppressorgen, die eine Rolle im Rahmen der Karzinogenese spielen. Darüber hinaus hat sich mit den Erkenntnissen über die Inaktivierung von miRNA mittels DNA-Methylierung (Lujambio et al., 2007) ein neues Forschungsgebiet entwickelt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum Einen, die Promotormethylierung zweier potentieller Tumorsuppressorgene zu analysieren und diese auf Ihre Eignung als prädiktiver oder prognostischer Marker beim KRK zu prüfen. Die beiden Gene, PRKACB und RASAL1, waren in zuvor durchgeführten Affymetrix-Array-Analysen im Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe als geeignete Kandidatengene identifiziert worden (unveröffentlichte Daten). In diesem Zusammenhang wurde zunächst die Promotormethylierung von PRKACB und RASAL1 in KRK untersucht und mit dem Profil verschiedener, bereits vorliegender, molekular- und histopathologischer Marker verglichen. Zudem wurde eine Analyse des Zusammenhangs zwischen epigenetischen Veränderungen am RASAL1-Promotor und der RASAL1-Expression vorgenommen. Als weiterer Aspekt ergab sich die Frage, ob die genannten Marker jeweils als Surrogatmarker des CIMP-Pathway einzustufen sind oder von diesem unabhängig betrachtet werden müssen.

### 5.1 CIMP

Nach zahlreichen Methylierungsanalysen verschiedener Gen-Loci in kolorektalen Tumoren hatte sich herausgestellt, dass bei bestimmten KRK eine umfassende Hypermethylierung verschiedener Promotorregionen vorliegt. Von Toyota et al. war dieses Phänomen erstmals als eigenständige Subgruppe mit der Ausprägung eines CpG-Island-Methylator-Phänotyp beschrieben worden, sodass Tumoren in CIMP+ und CIMP- eingestuft wurden. Nachdem sich zunächst eine Diskussion über Vorhandensein und Relevanz entspannte, hat das Modell zuletzt eine breite Akzeptanz gefunden. Ein Punkt, der möglicherweise zu diskrepanten Ergebnissen führte, war die Verwendung unterschiedlicher Markerpanels bei der Untersuchung des CIMP-Status. Zudem

scheinen innerhalb der CIMP-Tumoren wiederum spezifische Subgruppen zu existieren. Tabelle 5.1 gibt hierüber einen Überblick.

Toyota et al., 1999	CDKN2A (p16), MINT1, MINT2, MINT12, MINT17, MINT25, MINT27, MINT31, MLH1, THBS	Etablierung eines Panels, um CIMP von altersbedingter Hypermethylierung zu unterscheiden
Park et al., 2003	CDKN2A, MINT1, MINT2, MINT31, MLH1	Sogenanntes „klassisches“ oder traditionelles Panel
Weisenberger et al., 2006	CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3, SOCS1	Neues Panel nach Screening von 195 Markern
Ogino et al., 2006	CACNA1G, CDKN2A, CRABP1, MLH1, NEUROG1	Panel zur Unterscheidung von CIMP high und low
Shen et al., 2007	CIMP1: MINT1, MLH1, RIZ1, TIMP3, BRAF-Mutation; CIMP2: MINT2, MINT27, MINT31, Megalin, KRAS-Mutation	Panel mit genetischen und epigenetischen Markern zur Einteilung in CIMP1, CIMP2 und CIMP-
Tanaka et al., 2010	CACNA1G, CDKN2A, CHFR, CRABP1, HIC1, IGF2, IGFBP3, MGMT, MINT1, MINT31, NEUROG1, p14, RUNX3, SOCS1, WRN	KRAS- und BRAF-Mutationsstatus korrelieren mit CIMP high und low
Ang et al., 2010	202 CpG-Inseln, die sich zwischen Tumor- und Normalgewebe unterscheiden	DNA-Methylierungsprofil von 807 Genen, Aufteilung in CIMP high, mid und low
Kaneda und Yagi, 2011	<i>Gruppe 1:</i> IGF2, LOX, MINT1, MINT2, MINT31, MLH1, RUNX3, SOCS1; <i>Gruppe 2:</i> ADAMTS1, DUSP26, EDIL3, ELMO1, FBN2, HAND1, IGFBP3, NEUROG1, RASSF2, STOX2, THBD, UCHL1	Zwei Panels zur Einteilung in CIMP high, mid und low

*Tabelle 5.1: Übersicht über verschiedene Markerpanels zur CIMP-Klassifikation nach Curtin et al., 2011*

Am ehesten hat sich über die letzten Jahre das Markerpanel (sogenanntes „neues Panel“) nach Weisenberger und Kollegen etabliert, aus dem für die vorliegende Arbeit vier von fünf Markern übernommen wurden, ergänzt durch einen klassischen Marker (p16). Dessen Methylierungsdaten sowie die zu RUNX3 und SOCS1 lagen bereits vor und konnten zur Ergänzung des Markerpanels verwendet werden. Analog zu Weisenberger

wurden alle Tumoren mit mindestens drei methylierten von fünf untersuchten Loci als CIMP+ gewertet, die übrigen als CIMP-. Zur Aufteilung in methylierte und nicht-methylierte Marker war von Weisenberger und Kollegen ein Grenzwert von 10 % festgelegt worden. In den hier beschriebenen Methylierungsanalysen zu IGF2, NEUROG1, PRKACB und RASAL1 wurde der Schwellenwert bei 5 % gewählt, da sich bei diesem Wert eine höhere Übereinstimmung der CIMP-Marker untereinander sowie mit BRAF-Mutation und MSI ergab. Möglicherweise spielt hierbei die Methode zur Methylierungsanalyse eine Rolle, beispielsweise könnten Sensitivitätsunterschiede zwischen MethyQESD und der von Weisenberger eingesetzten MethyLight hierfür verantwortlich sein.

Die Unterscheidung in CIMP high und low bzw. CIMP1 und CIMP2 hat erst kürzlich an Bedeutung gewonnen und kam in dieser Dissertation nicht zur Anwendung. Aktuelle Daten deuten darauf hin, dass sich CIMP1 und CIMP2 insbesondere in der Korrelation mit BRAF- bzw. KRAS-Mutationen unterscheiden (Tanaka et al., 2010; Ang et al., 2010; Kaneda und Yagi, 2011). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sich BRAF- und KRAS-Mutationen gegenseitig ausschließen, lässt sich somit durch Mutationsanalyse eine Einteilung in CIMP1 und CIMP2 vornehmen. Es ist aber weiterhin nicht gänzlich geklärt, warum beide Mutationen nicht in ein und demselben Tumor auftreten. Ein zentraler Punkt scheint hierbei die Zugehörigkeit zum selben Pathway zu sein (Ogino und Goel, 2008). Diese molekularpathologischen Erkenntnisse decken sich mit den neuen Klassifikationen der pathologischen Diagnostik (Traditionelles serratiertes Adenom, sessiles serratiertes Adenom etc.) und gehen in die Beschreibung neuer Karzinogenese-Pathways ein, siehe Abbildung 1.2. Insgesamt ergibt sich allein unter Verwendung der zentralen Parameter CIMP1, CIMP2, CIMP- sowie MSI high, MSI low, MSS eine Fülle von unterschiedlichen Konstellationen, die molekularpathologisch beschrieben werden können. Manche Autoren fordern in diesem Zusammenhang sogar, die Subgruppen der KRK wie eigenständige Krankheiten zu betrachten (Ogino et al., 2011).

Welche klinische Relevanz bieten die neuen Klassifikationen? Prinzipiell scheint CIMP+ mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein als CIMP- (Ogino et al., 2007). Hier wird ein Zusammenhang mit der in diesen Tumoren häufig beobachteten BRAF-Mutation vermutet, die sich als ungünstiger prognostischer Faktor herausgestellt hat (Ogino et al., 2009). In Bezug auf die Eignung von CIMP als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf fluoropyrimidin-basierte Chemotherapie existieren jedoch

widersprüchliche Ergebnisse. Tabelle 5.2 bietet eine Übersicht über die zentralen Ergebnisse verschiedener Studien.

van Rijnsoever et al., 2003	CIMP+: signifikante Überlebensverlängerung durch 5-FU
Ogino et al., 2007	CIMP+: signifikant verringertes Gesamtüberleben, Resistenz gegen Polychemotherapie (5-FU, Leucovorin, Irinotecan, Gefitinib). Mittleres Gesamtüberleben: CIMP high 0,9 Jahre, CIMP low/- 1,9 Jahre, $p=0,0004$ .
Shen et al., 2007	CIMP+: schlechteres Ansprechen auf 5-FU. Medianes Gesamtüberleben: CIMP high 0,5 Jahre, CIMP low 1,4 Jahre, $p<0,0001$ .
Ogino et al., 2008	CIMP+: signifikant niedrigere tumorspezifische Todesrate als CIMP- unter 5-FU-Therapie (multivariate HR 0,44)
Kim et al., 2009	CIMP+/MSI-: in dieser Markerkombination reduziertes Gesamtüberleben. 5-Jahres-Überlebensrate: CIMP-/MSI- 64,4 %; CIMP-/MSI+ 90,3 %; CIMP+/MSI- 44,0 %; CIMP+/MSI+ 91,6 %;
Dahlin et al., 2010	Signifikant niedrigere tumorspezifische Todesrate bei CIMP-negativen Tumoren im Vergleich zu CIMP-low (HR=2,01; $p=0,0008$ )
Min et al., 2011	CIMP high: signifikant verlängertes DFS durch adjuvante 5-FU-Therapie im Vergleich zu alleiniger Operation (3-Jahres-DFS 100 % vs. 71,4 %, $p=0,022$ )  CIMP low und CIMP-: kein signifikant verlängertes DFS durch adjuvante 5-FU-Therapie im Vergleich zu alleiniger Operation (3-Jahres-DFS 82,4 % vs. 86,5 %, $p=0,988$ )
Jover et al., 2011	CIMP+: keine Verlängerung des DFS durch 5-FU (6-Jahres-DFS 57,7 % vs. 68,4 %, $p=0,7$ )  CIMP-: signifikant längeres DFS durch 5-FU (6-Jahres-DFS 80,0 % vs. 45,6 %, $p=0,02$ )

*Tabelle 5.2: Studien zu CIMP als prognostischer und prädiktiver Faktor*

In Anbetracht der oben genannten Ergebnisse bleibt die Eignung des CIMP-Status zur Prädiktion des Ansprechens auf Chemotherapie weiterhin unklar. Mögliche Erklärungen für die diskrepanten Daten sind auch hier die Verwendung unterschiedlicher Markerpanels und Methoden der Methylierungsanalyse sowie eine teilweise getrennte Betrachtung von CIMP high und low. Eine Standardisierung der verwendeten Methoden, Panels, Grenzwerte und Klassifikationen könnte hier möglicherweise Abhilfe schaffen. Darüber hinaus sollten diese zentralen Fragen der klinischen Relevanz in prospektiven, randomisierten Studien weiter untersucht werden.

### 5.1.1 IGF2

Die Expression von IGF2 wird über genomisches Imprinting reguliert. Eine Promotorhypermethylierung scheint keine bedeutende funktionelle Rolle in KRK zu haben, jedoch eignet sich IGF2 sehr gut als Marker für die globale Hypermethylierung des CIM-Phänotyps (Weisenberger et al., 2006). Nach bisherigen Erkenntnissen ist für die Eignung als prognostischer Parameter eher ein „loss of imprinting“ verantwortlich, möglicherweise auch eine Hypomethylierung einer intragenisch gelegenen Region (Baba et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich die Promotormethylierung mittels MethyQESD untersucht, um zusammen mit den oben angegebenen Markern ein Vergleichspanel für PRKACB und RASAL1 zu entwickeln. In unserem Kollektiv lieferte die MethyQESD für einen Großteil der untersuchten KRK verwertbare Ergebnisse bzgl. IGF2. Bei dem gewählten Grenzwert lagen 23,2 % Methylierungspositive und 76,8 % Methylierungsnegative vor, in der Literatur liegen die Werte bei 10 % in einem kleinen Kollektiv (n=30) bzw. 23,4 % in einem großen, repräsentativen Kollektiv mit 920 Fällen (Ogino et al., 2006; Ogino et al., 2007). Im Vergleich mit anderen histo- und molekularpathologischen Parametern (siehe Tabelle 3.8) finden sich signifikante Korrelationen mit erniedrigtem Differenzierungsgrad, BRAF-Mutation und MSI. Die genannten Zusammenhänge lassen sich durch die Eignung von IGF2 als CIMP-Marker erklären (Weisenberger et al., 2006; Ogino et al., 2006; Tanaka et al., 2010).

### 5.1.2 NEUROG1

Das Gen NEUROG1 wurde als zweiter CIMP-Marker dem Panel hinzugefügt. Dessen Rolle in KRK ist weitestgehend unbekannt, es wird jedoch – ähnlich wie IGF2 – als gut geeigneter Surrogatmarker für den CIMP-Pathway beschrieben (Weisenberger et al., 2006; Kaneda und Yagi, 2011). In den MethyQESD-Analysen konnte mit 44,2 % eine vergleichsweise hohe Rate an Hypermethylierten identifiziert werden. Der Prozentsatz liegt hierbei höher als in bisherigen Studien beschrieben, in der Literatur finden sich Angaben von 23,3 bzw. 29,4 % Methylierten in den untersuchten KRK (Ogino et al., 2006; Ogino et al., 2007). Einen möglichen Erklärungsansatz bietet auch hier die Verwendung unterschiedlicher Methoden (MethyLight vs. MethyQESD) zur Methylierungsanalyse. Betrachtet man die an NEUROG1 hypermethylierte Gruppe, so fällt auf, dass diese in besonderem Maße von einer fluoropyrimidinhaltigen Therapie profitieren. Das mittlere Gesamtüberleben unterscheidet sich bei diesen signifikant:



ohne Chemotherapie beträgt es 58,6 Monate, mit Systemtherapie dagegen 97,8 Monate. Dies wirft die Frage auf, ob sich dieses Gen als prädiktiver Marker für 5-FU-Therapie eignet. Wie oben beschrieben gibt es in der Literatur jedoch widersprüchliche Daten zur Eignung der CIMP-Klassifikation als prädiktiver Marker, siehe Tabelle 5.2. Des Weiteren ist eine Tendenz zu einer schlechteren Prognose bei CIMP+ Tumoren zu erkennen, ohne im untersuchten Kollektiv jedoch signifikant zu sein. In diesem Zusammenhang sind prospektive, randomisierte Studien notwendig, um gezielt den Nutzen der Chemotherapie bei den verschiedenen Subgruppen des KRK zu analysieren.

Weiterhin korreliert die Hypermethylierung des NEUROG1-Promotors mit einem signifikant niedrigeren Differenzierungsgrad der untersuchten KRK ( $p=0,02$ ). Zudem sind sieben von acht BRAF-mutierten Fällen als methylierungspositiv für NEUROG1 eingestuft worden, auch diese Korrelation ist signifikant ( $p=0,025$ ). Analog zur Verwendung als CIMP-Marker sind die Korrelationen mit denen zu IGF2 vergleichbar und kongruent mit vorhandenen Daten aus der Literatur (Weisenberger et al., 2006; Ogino et al., 2006; Tanaka et al., 2010). Neben der Anwendung als CIMP-Marker könnte NEUROG1 in der Zukunft als Marker zur Früherkennung von KRK im Serum Eingang in die Diagnostik finden (Herbst et al., 2011), dies wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

## 5.2 PRKACB

Die katalytische Untereinheit  $\beta$  der Proteinkinase A wurde hinsichtlich ihrer Eignung als prädiktiver oder prognostischer Faktor analysiert. Die Proteinkinase A ist an zahlreichen regulatorischen Prozessen, die u. a. das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung beeinflussen, beteiligt. Bisher gibt es widersprüchliche Aussagen über ihre Zuordnung als Tumorsuppressor oder Onkogen (Yokozaki et al., 1993; Carslon et al., 1999; Baba et al., 2010). Die PKA agiert in Abhängigkeit von den beiden regulatorischen Untereinheiten, RI und RII. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der RI-Einheit in KRK-Zelllinien eine vermehrte Proliferation und neoplastische Transformation zur Folge hat (Cho-Chung und Clair, 1993). In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus jedoch auf der katalytischen Untereinheit  $\beta$  der Proteinkinase A. In den vorgeschalteten Arrayuntersuchungen konnte eine weitgehende Suppression der PRKACB in kolorektalen Tumoren festgestellt werden, was eher die Einstufung als Tumorsuppressor nahelegt. Nachdem unklar ist, ob und welche epigenetischen

Mechanismen bei der Regulation der PRKACB-Funktion eine Rolle spielen, lag das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit auf der Promotorregion und deren Methylierung. Im vorliegenden Kollektiv konnte nicht bei allen untersuchten KRK ein verwertbares Ergebnis erreicht werden. Zudem fand sich mit 16,9 % eine – verglichen mit den CIMP-Markern IGF2 und NEUROG1 – geringe Rate an Methylierungspositiven bzgl. des PRKACB-Promotors. Auffallend ist die signifikante Verknüpfung des positiven Methylierungsstatus zum Einen mit nicht vorhandener chromosomaler Instabilität ( $p=0,006$ ), zum Anderen mit MSI ( $p=0,014$ ) und CIMP+ ( $p<0,001$ ). Somit ist die PRKACB bzgl. ihrer Promotormethylierung am ehesten als CIMP-Surrogatmarker einzustufen. Analog dazu findet sich auch bei diesem Marker für die Methylierten eine Tendenz zu schlechterem Gesamtüberleben bei nicht applizierter 5-FU-Therapie. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Expression von PRKACB im Rahmen von CIMP über die Promotormethylierung reguliert wird. Zudem dürften weitere epigenetische oder genetische Prozesse eine Rolle spielen, da die durchgeführte Arrayuntersuchung einen höheren Anteil von KRK mit verminderter Expression im Tumorgewebe zeigt. Für diese Regulation kommen aber neben der Promotormethylierung auch Umwelteinflüsse in Frage: es wurde gezeigt, dass die vermehrte Einnahme von Selenomethionin mit einer verringerten PRKACB-Genexpression auf cDNA-Ebene korreliert. Verantwortlich hierfür scheint eine über Histon H3 vermittelte Veränderung der Chromatinstruktur zu sein (Goulet et al., 2007).

### 5.3 RASAL1

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand das Gen RASAL1. Es hat als Vertreter der GAPs im Zusammenhang mit der Regulation der RAS-Funktion einen entscheidenden Einfluss auf Zellproliferation und -differenzierung (Sprang, 1997; Symons und Settelmann, 2000). Nachdem in zahlreichen Studien die Funktion von KRAS bei der kolorektalen Karzinogenese untersucht wurde, konnte mit der verminderten Expression von RASAL1 in verschiedenen Tumorgeweben ein potentieller weiterer Negativ-Regulator des RAS-RAF-MAP-Kinase-Pathway beschrieben werden (Kolfshoten et al., 2005; Jin et al., 2007). Als zugrunde liegender Mechanismus für die verminderte RASAL1-Expression in manchen KRK war zunächst die Regulation über den Transkriptionsfaktor PITX1 diskutiert worden (Kolfshoten et al., 2005). Jedoch hatten sich in weiteren Untersuchungen diesbezüglich diskrepante Daten ergeben (Jin et al., 2007; Ohta et al., 2009; Calvisi et al., 2011). Als weiterer

Mechanismus konnte der Einfluss der Promotorhypermethylierung auf die RASAL1-Expression gezeigt werden. Tabelle 5.3 bietet eine Übersicht über die bereits in der Literatur vorhandenen Daten:

Referenz	Inhalt	Untersuchte Gewebe
Kolfschoten et al., 2005	<p>Supprimierte PITX1-Expression aktiviert den RAS-Pathway</p> <p>Reduzierte PITX1-Expression korreliert mit verminderter RASAL1-Aktivität</p> <p>Reduzierte RASAL1-Expression wirkt tumorigen</p> <p>PITX1-Knockdown wirkt proliferationsfördernd</p> <p>Verminderte PITX1-Expression korreliert mit KRAS-wt</p>	<p>KRK-Zelllinien</p> <p>embryonale Zelllinie</p> <p>Tumorzelllinie der Prostata</p> <p>KRK-Zelllinien</p>
Jin et al., 2007	<p>RASAL1 wird in verschiedenen Geweben exprimiert</p> <p>Herunterregulation der RASAL1-Expression vorhanden</p> <p>Keine PITX1-Expressionsreduktion vorhanden</p> <p>RASAL1-Promotorhypermethylierung korreliert mit Silencing</p> <p>Demethylierung mit DNA-Methyltransferase-Inhibitor hat eine erhöhte RASAL1-Expression zur Folge</p> <p>Ektopische Expression wirkt wachstumshemmend, aber nicht bei KRAS-Mutation</p>	<p>Normalgewebe von Gehirn, Haut, Blase, Kopf-Hals</p> <p>Tumorzelllinien von Nasopharynx, Brust, Lunge, Leber, Ösophagus, Lymphomen</p> <p>Tumoren des Nasopharynx, Ösophagus, Brust</p> <p>Tumorzelllinien von Nasopharynx, Brust, Leber, Ösophagus</p> <p>verschiedene Tumorzelllinien</p>
Ohta et al., 2009	<p>Reduzierte RASAL1-Expression korreliert mit wt-KRAS</p> <p>RASAL1 hemmt den MAPK-Pathway</p> <p>Knockdown vermehrt Zellproliferation</p> <p>Methylierung korreliert mit reduzierter mRNA-Expression, nicht mit PITX1-Expression</p> <p>RASAL1-Silencing moderat in 46,9 %, stark in 21,9 %</p> <p>RASAL1-Expression korreliert mit distalem Sitz von KRK und abnormer P53-Expression</p>	<p>KRK-Zelllinien</p> <p>152 KRK</p>

Calvisi et al., 2011	Herunterregulation der RASAL1-Expression in HCC	HCC
	Promotorhypermethylierung in 56,8 % der HCC, korrelierend mit Herunterregulation der Expression	
	Alle HCC zeigen Promotorhypermethylierung an mindestens einem GAP	
	Inhibition von PITX1 führt zur RASAL1-Inaktivierung	HCC-Zelllinie
	RASAL1-Inhibition führt zur Zellproliferation	
Seto et al., 2011	RAS-GAP-Hypermethylierung und RAS-Mutationen schließen sich gegenseitig aus. RASAL1-Hypermethylierung in 26,7 % der KKK	Tumoren von Brust, Lunge, Pankreas, Kolon (n=30)
	Knockdown aktiviert MAPK-Pathway	Magen-Ca-Zelllinien
	Verstärkte Expression reduziert Zellproliferation.	
	Reduzierte Expression in 48 % der Magenkarzinome, nicht in Adenomen	Magen-Ca
	Promotorhypermethylierung und LOH als Mechanismen, Methylierung immer wenn reduzierte Expression	Magen-Ca-Zelllinien
	Deazetylierung stellt die RASAL1-Expression wieder her	

*Tabelle 5.3: Bisherige Referenzen über die Rolle von RASAL1 in verschiedenen Tumoren*

In der vorliegenden Arbeit sollte nun zum ersten Mal ein größeres Kollektiv kolorektaler Tumoren hinsichtlich ihrer Promotormethylierung und deren potenziellem Zusammenhang mit der Genexpression von RASAL1 geprüft werden.

Im vorliegenden Kollektiv konnte eine relativ selten vorkommende Hypermethylierung des RASAL1-Promotors festgestellt werden: Sechs von 207 untersuchten KKK wiesen einen positiven Methylierungsstatus auf. Im Gegensatz zu PRKACB ergab sich – bei allerdings geringer Zahl an methylierten Fällen – keine signifikante Korrelation mit CIMP. Bereits in Anbetracht der Verteilung von methylierten und nicht methylierten Patienten unterscheidet sich RASAL1 grundlegend von klassischen CIMP-Markern wie IGF2 und NEUROG1, aber auch von PRKACB. Das deutet darauf hin, dass RASAL1 kein Surrogatmarker des CIMP-Pathway ist. Interessanterweise wurde im untersuchten Kollektiv jedoch eine vergleichsweise niedrige Rate an RASAL1-Methylierungspositiven festgestellt: Ohta und Kollegen hatten bei einer Fallzahl von 152 KKK in 46,9 % der

Tumoren eine moderate und in 21,9 % der Karzinome eine starke Herunterregulation der RASAL1-Expression detektiert, ohne jedoch die Promotormethylierung an den Tumoren zu untersuchen (Ohta et al., 2009). In einem kleinen Kollektiv von 30 HCC-Patienten wiesen 26,7 % eine RASAL1-Hypermethylierung auf (Calvisi et al., 2011). Die diskrepanten Ergebnisse könnten neben der unterschiedlichen Fallzahl auch in den verwendeten Methoden zur Methylierungsanalyse begründet sein, bei Calvisi kam die methylierungsspezifische PCR nach Bisulfitmodifikation zum Einsatz, in der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse mittels MethyQESD (siehe 3.3.2).

Eine weitere Fragestellung war, ob RASAL1 als alternativer Aktivierungsweg des MAP-Kinase-Pathway unabhängig von KRAS-Mutationen agieren könnte, indem durch reduzierte RASAL1-Aktivität KRAS vermehrt in der aktiven, GTP-bindenden Form vorliegt. Hier ergab sich ein signifikanter, gegensätzlicher Zusammenhang mit dem KRAS-Mutationsstatus: in Kongruenz zu den Daten von Ohta et al. sind alle sechs am RASAL1-Promotor hypermethylierten KRK KRAS-Wildtyp, wohingegen bei Methylierungsnegativen eine weitgehend gleiche Verteilung vorliegt (Verhältnis 4:3 von Wildtyp zu mutiert). In ähnlicher Weise ist dieses Phänomen bei BRAF-Mutationen, die nicht gleichzeitig mit KRAS-Mutationen auftreten und ebenfalls eine Aktivierung des MAP-Kinase-Pathway zur Folge haben, in der Literatur beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass sich eine RASAL1-Methylierung und sowohl KRAS- als auch BRAF-Mutationen gegenseitig ausschließen. Was BRAF-Mutationen betrifft wird zum Einen vermutet, dass dies auf Grund der Zugehörigkeit zum gleichen Pathway zustande kommt (Ogino und Goel, 2008). Zum Anderen ist eine denkbare Theorie, dass eine KRAS- oder BRAF-Mutation einen derart malignitätsfördernden und proliferativen Effekt zur Folge hat, dass im begrenzten Zeitraum bis zum Auftreten von Symptomen bzw. der Diagnose keine weiteren Mutationen oder Promotorhypermethylierungen entstehen. Bei KRAS- und BRAF-Wildtyp-Tumoren können dann andere, seltenere Alterationen wie z. B. eine Herunterregulation oder Stilllegung von RASAL1 durch Promotormethylierung zur Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs führen.

Erwartungsgemäß sollte die RASAL1-Promotorhypermethylierung eine Herunterregulation der RASAL1-Expression zur Folge haben. In Kongruenz dazu fand sich bei allen sechs methylierten Fällen eine verringerte RASAL1-Expression auf mRNA-Ebene im Tumor verglichen mit dem Normalgewebe (Ratio Tumor-/Normalgewebe zwischen 0,05 und 0,42). Zusätzlich konnte in der gleichen

Anzahl untersuchter nicht methylierter Fälle lediglich in einem Fall eine Herunterregulation im Tumor nachgewiesen werden, bei den übrigen Patienten zeigte sich eine tendenziell stärkere Expression im Tumorgewebe (ratio Tumor-/Normalgewebe zwischen 0,20 und 10,48). Somit konnte ein Zusammenhang zwischen der Hypermethylierung des RASAL1-Promotors und verringerter Expression auf mRNA-Ebene erstmals in kolorektalen Karzinomen gezeigt werden.

Dennoch liegt in Anbetracht der niedrigen Zahl an RASAL1-Methylierten der Schluss nahe, dass weitere Mechanismen bei der Regulation der Expression von RASAL1 eine Rolle spielen. Insbesondere der Vergleich mit den Expressionsanalysen von Ohta und Kollegen stützt diese Vermutung. Der initial von Kolfshoten et al. beschriebene Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor PITX1 konnte nicht in allen weiteren Untersuchungen bestätigt werden. Nach dessen Ergebnissen hat eine erhöhte PITX1-Expression eine ebenso vermehrte RASAL1-Expression zur Folge, der Knockdown von PITX1 korrelierte mit deutlich verringerter RASAL1-Expression (Kolfshoten et al., 2005). Dagegen konnte in folgenden Untersuchungen keine Reduktion der PITX1-Expression in verschiedenen Tumorzelllinien und keine Korrelation mit erniedrigter RASAL1-Expression festgestellt werden (Jin et al., 2007; Ohta et al., 2009). Calvisi und Kollegen zeigten wiederum eine verminderte RASAL1-Expression nach PITX1-Inhibition mittels siRNA in HCC-Zelllinien. In 25 von 37 (67,6 %) untersuchten HCC wurde des Weiteren eine Hypermethylierung des PITX1-Promotors detektiert, in der Zellkultur hatte die Behandlung mit demethylierenden Agenzien zudem ein erhöhtes PITX1-Level zur Folge (Calvisi et al., 2011). Die potentielle Regulation von RASAL1 durch PITX1 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht. Letztlich bleibt die Datenlage in diesem Punkt diskrepant.

In Zukunft werden weitere Studien notwendig sein, um in größeren Kollektiven die epigenetischen Veränderungen an RASAL1 in KRK zu untersuchen und andere Regulatoren der RASAL1-Expression zu identifizieren. Da RASAL1 einen alternativen KRAS-Aktivierungsweg bietet, ist seine Eignung auch als potentieller prädiktiver Marker für anti-EGFR-gerichtete Therapie von Interesse. Nachdem gezeigt wurde, dass bei einer konstitutiven Aktivierung des RAS-RAF-MAP-Kinase-Pathway durch KRAS-Mutationen eine Therapie mit Panitumumab keine Überlegenheit gegenüber „best supportive care“ aufweist (Amado et al., 2006), könnte ebenso die epigenetische Stilllegung von RASAL1 ein zusätzlicher Biomarker sein, um die Gruppe von weniger sensiblen Tumoren zu identifizieren und von der auf EGFR-Therapie ansprechenden

Gruppe zu unterscheiden. Die Promotorhypermethylierung von RASAL1 tritt im vorliegenden Kollektiv mit einer Häufigkeit von 3 % zwar relativ selten auf, jedoch haben auch Mutationen von N-RAS und B-RAF, die bei 5 bzw. 7 % der KRK nachzuweisen sind, Eingang in die klinische Routinediagnostik gefunden (Peeters et al., 2013).

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation setzt sich mit den beiden molekularen Markern RASAL1 und PRKACB auseinander, um ihre Eignung als potentielle prädiktive oder prognostische Parameter beim kolorektalen Karzinom zu prüfen. Für diesen Zweck wurden zunächst retrospektiv klinische Daten gesammelt, um den Zusammenhang der Marker mit dem Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der epigenetischen Regulation in den untersuchten KRK zu analysieren.

Im Rahmen der molekularen Untersuchungen wurde an PRKACB und RASAL1 die epigenetische Veränderung, im Genauen die Methylierung der Promotorregion, an 156 bzw. 207 kolorektalen Tumoren untersucht. Zudem wurde an denselben Geweben ein Markerpanel etabliert, um deren Zugehörigkeit zum CpG-Insel-Methylator-Phänotyp zu prüfen. Dabei konnte auf Daten von drei bereits vorliegenden CIMP-Markern (SOCS1, RUNX3, p16) zurückgegriffen werden, die um zwei neue (IGF2, NEUROG1) ergänzt wurden. Jeder Tumor, der an mindestens drei von fünf CIMP-Markern eine Promotorhypermethylierung aufweist, wurde als CIMP-positiv eingestuft. Bezüglich des für PRKACB kodierenden Gens zeigte sich für die nicht methylierten Fälle ein signifikanter Überlebensvorteil durch 5-FU-haltige Therapie. Die Methylierungspositiven weisen einen dahingehenden Trend auf, jedoch ohne statistische Signifikanz bei geringer Fallzahl in dieser Gruppe. Des Weiteren konnte ein signifikanter Zusammenhang des PRKACB-Methylierungsstatus mit dem CIMP-Status nachgewiesen werden, somit ist dieser Marker am ehesten als ein weiterer Parameter für CIMP einzuordnen. Die Ergebnisse stützen die Untersuchungen, die für CIMP+ einen signifikanten Nutzen fluoropyrimidin-haltiger Therapie ergaben, jedoch bleibt die Datenlage in diesem Punkt diskrepant (u. a. van Rijnsoever et al., 2003; Ogino et al., 2008; Jover et al., 2011).

Im Fokus der Untersuchungen lag der Marker RASAL1, der in bisherigen Untersuchungen als alternativer KRAS-Aktivierungsweg diskutiert wird. Bislang wurde dessen Promotormethylierung bei KRK nicht in einem repräsentativen Kollektiv untersucht. Im vorliegenden Kollektiv konnte eine Promotorhypermethylierung von RASAL1 bei 6 von 207 (3 %) der KRK festgestellt werden. In Anbetracht der Daten von Ohta, der in 46,9 % der untersuchten KRK eine mäßig bzw. in 21,9 % eine stark verminderte RASAL1-Expression zeigen konnte, wäre ein höherer Prozentsatz zu erwarten gewesen. Die Promotormethylierung hingegen wurde in dessen Arbeit im



Gegensatz zur Expression lediglich in Zelllinien untersucht, sodass diesbezüglich kein Vergleich möglich ist. Es stellt sich die Frage nach potentiellen weiteren Regulatoren der RASAL1-Expression. In diesem Zusammenhang wurde in der Literatur zuvor der Transkriptionsfaktor PITX1 beschrieben, wobei die Untersuchung von dessen Einfluss auf die RASAL1-Expression in verschiedenen Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse ergab (Kolfshoten et al., 2005; Jin et al., 2007; Ohta et al., 2009; Calvisi et al., 2011).

Auf der einen Seite ist somit die Promotorhypermethylierung im untersuchten Kollektiv relativ selten. Auf der anderen Seite ist es aber bemerkenswert, dass sich RASAL1-Hypermethylierung und KRAS-Mutation gegenseitig ausschließen. Aus dieser Tatsache ergibt sich eine statistisch signifikante, gegensätzliche Korrelation der beiden Parameter. Zudem wurden keine BRAF-Mutationen in RASAL1-methylierten KRK nachgewiesen, wobei nicht zu allen KRK BRAF-Mutationsanalysen vorlagen. Des Weiteren konnte bei allen an RASAL1 methylierten Fällen eine reduzierte RASAL1-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang mit CIMP besteht im Vergleich mit dem Markerpanel bei allerdings geringer Fallzahl nicht. Es gibt demzufolge keine Hinweise darauf, dass RASAL1 als Surrogatmarker des CIMP-Pathway einzustufen wäre. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um andere regulatorische Mechanismen der RASAL1-Expression zu untersuchen. Zudem ist von Interesse, inwieweit sich RASAL1 als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf anti-EGFR-gerichtete Therapie eignet. Auch um diesen Zusammenhang einzuordnen, sind prospektive, randomisierte Studien erforderlich. Zwar tritt die Stilllegung von RASAL1 durch Promotorhypermethylierung im vorliegenden Kollektiv mit 3 % relativ selten auf, jedoch haben auch N-RAS- und B-RAF-Mutationen bei einer Häufigkeit von 5 bzw. 7 % Eingang in die klinische Routinediagnostik gefunden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aaltonen, L. A.; Salovaara, R.; Kristo, P.; Canzian, F.; Hemminki, A.; Peltomäki, P. et al. (1998): Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. In: *N Engl J Med* 338 (21), S. 1481–1487.
- Allen, M.; Chu, S.; Brill, S.; Stotler, C.; Buckler, A. (1998): Restricted tissue expression pattern of a novel human rasGAP-related gene and its murine ortholog. In: *Gene* 218 (1-2), S. 17–25.
- Amado, Rafael G.; Wolf, Michael; Peeters, Marc; van Cutsem, Eric; Siena, Salvatore; Freeman, Daniel J. et al. (2008): Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. In: *J. Clin. Oncol* 26 (10), S. 1626–1634.
- Ang, Pei Woon; Loh, Marie; Liem, Natalia; Lim, Pei Li; Grieu, Fabienne; Vaithilingam, Aparna et al. (2010): Comprehensive profiling of DNA methylation in colorectal cancer reveals subgroups with distinct clinicopathological and molecular features. In: *BMC Cancer* 10, S. 227.
- Baba, Yoshifumi; Nosho, Katsuhiko; Shima, Kaori; Huttenhower, Curtis; Tanaka, Noriko; Hazra, Aditi et al. (2010): Hypomethylation of the IGF2 DMR in colorectal tumors, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. In: *Gastroenterology* 139 (6), S. 1855–1864.
- Baba, Y.; Nosho, K.; Shima, K.; Meyerhardt, J. A.; Chan, A. T.; Engelman, J. A. et al. (2010): Prognostic significance of AMP-activated protein kinase expression and modifying effect of MAPK3/1 in colorectal cancer. In: *Br J Cancer* 103 (7), S. 1025–1033.
- Baretton, G.B (2010): Der serratierte Karzinogeneseweg im Kolorektum. In: *Pathologe* 31 (1), S. 9–15.
- Baylin, S. B.; Herman, J. G.; Graff, J. R.; Vertino, P. M.; Issa, J. P. (1998): Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. In: *Adv Cancer Res* 72, S. 141–196.
- Bell, A. C.; West, A. G.; Felsenfeld, G. (1999): The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. In: *Cell* 98 (3), S. 387–396.
- Bernards, Andre; Settleman, Jeffrey (2004): GAP control: regulating the regulators of small GTPases. In: *Trends Cell Biol* 14 (7), S. 377–385.
- Bilkay, Ufuk; Erdem, Ozgur; Ozek, Cuneyt; Helvacı, Evren; Kilic, Kamil; Ertan, Yesim; Gurler, Tahir (2004): Benign osteoma with Gardner syndrome: review of the literature and report of a case. In: *J Craniofac Surg* 15 (3), S. 506–509.
- Bird, A. P. (1986): CpG-rich islands and the function of DNA methylation. In: *Nature* 321 (6067), S. 209–213.
- Bisgaard, M. L.; Fenger, K.; Bülow, S.; Niebuhr, E.; Mohr, J. (1994): Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. In: *Hum. Mutat* 3 (2), S. 121–125.
- Bodmer, W. F.; Bailey, C. J.; Bodmer, J.; Bussey, H. J.; Ellis, A.; Gorman, P. et al.: Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. In: *Nature* 328 (6131), S. 614–616.
- Brink, Mirian; Goeij, Anton F. P. M. de; Weijenberg, Matty P.; Roemen, Guido M. J. M.; Lentjes, Marjolein H. F. M.; Pachen, Marco M. M. et al. (2003): K-ras oncogene

- mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. In: *Carcinogenesis* 24 (4), S. 703–710.
- Bussey, H. J. (1979): Familial polyposis coli. In: *Pathol Annu* 14 Pt 1, S. 61–81.
- Calvisi, Diego F.; Ladu, Sara; Conner, Elizabeth A.; Seo, Daekwan; Hsieh, Jer-Tsong; Factor, Valentina M.; Thorgeirsson, Snorri S. (2011): Inactivation of Ras GTPase-activating proteins promotes unrestrained activity of wild-type Ras in human liver cancer. In: *Journal of Hepatology* 54 (2), S. 311–319.
- Chang, Shih-Ching; Lin, Jen-Kou; Yang, ShungHaur; Wang, Huann-Sheng; Li, AnnaFen-Yau; Chi, Chin-Wen (2006): Relationship between genetic alterations and prognosis in sporadic colorectal cancer. In: *Int J Cancer* 118 (7), S. 1721–1727.
- Chen, H. (2005): Down-regulation of Human DAB2IP Gene Expression Mediated by Polycomb Ezh2 Complex and Histone Deacetylase in Prostate Cancer. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (23), S. 22437–22444.
- Cho-Chung, Y. S.; Clair, T. (1993): The regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase as a target for chemotherapy of cancer and other cellular dysfunctional-related diseases. In: *Pharmacol Ther* 60 (2), S. 265–288.
- Ciardiello, F.; Tortora, G. (1998): Interactions between the epidermal growth factor receptor and type I protein kinase A: biological significance and therapeutic implications. In: *Clin Cancer Res* 4 (4), S. 821–828.
- Coulonval, K.; Maenhaut, C.; Dumont, J. E.; Lamy, F. (1997): Phosphorylation of the three Rb protein family members is a common step of the cAMP-, the growth factor, and the phorbol ester-mitogenic cascades but is not necessary for the hypertrophy induced by insulin. In: *Exp. Cell Res* 233 (2), S. 395–398.
- Curtin, Karen; Slattery, Martha L.; Samowitz, Wade S. (2011): CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. In: *Patholog Res Int* 2011, S. 902674.
- Dahlin, AnnaM; Palmqvist, Richard; Henriksson, MariaL; Jacobsson, Maria; Eklof, Vincy; Rutegard, Jorgen et al. (2010): The role of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer prognosis depends on microsatellite instability screening status. In: *Clin Cancer Res* 16 (6), S. 1845–1855.
- Day, D. W.; Morson, B. C. (1978): The adenoma-carcinoma sequence. In: *Major Probl Pathol* 10, S. 58–71.
- Deng, Guoren; Bell, Ian; Crawley, Suzanne; Gum, James; Terdiman, JonathanP; Allen, BrianA et al. (2004): BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. In: *Clin Cancer Res* 10 (1 Pt 1), S. 191–195.
- Duval, Alex; Hamelin, Richard (2002): Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. In: *Cancer Res* 62 (9), S. 2447–2454.
- Esteller, M.; Tortola, S.; Toyota, M.; Capella, G.; Peinado, M. A.; Baylin, S. B.; Herman, J. G. (2000): Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. In: *Cancer Res* 60 (1), S. 129–133.
- Goel, Ajay; Nagasaka, Takeshi; Arnold, ChristianN; Inoue, Toru; Hamilton, Cody; Niedzwiecki, Donna et al. (2007): The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. In: *Gastroenterology* 132 (1), S. 127–138.

- Goulet, Anne-Christine; Watts, George; Lord, JeanL; Nelson, MarkA (2007): Profiling of selenomethionine responsive genes in colon cancer by microarray analysis. In: *Cancer Biol Ther* 6 (4), S. 494–503.
- Hemminki, Akseli; Peltomäki, Päivi; Mecklin, Jukka-Pekka; Järvinen, Heikki; Salovaara, Reijo; Nyström-Lahti, Minna et al. (1994): Loss of the wild type MLH1 gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. In: *Nat Genet* 8 (4), S. 405–410.
- Herbst, Andreas; Rahmig, Konstanze; Stieber, Petra; Philipp, Alexander; Jung, Andreas; Ofner, Andrea et al. (2011): Methylation of NEUROG1 in serum is a sensitive marker for the detection of early colorectal cancer. In: *Am J Gastroenterol* 106 (6), S. 1110–1118.
- Hinoue, T.; Weisenberger, D. J.; Lange, C. P.; Shen, H.; Byun, H. M.; Van, DenBergD et al. (2011): Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. In: *Genome Res*.
- Hughes, Laura A.E; Khalid-de Bakker, Carolina A.J; Smits, Kim M.; van den Brandt, Piet A.; Jonkers, Daisy; Ahuja, Nita et al. (2012): The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: Progress and problems. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1825 (1), S. 77–85.
- Iacopetta, Barry; Kawakami, Kazuyuki; Watanabe, Toshiaki (2008): Predicting clinical outcome of 5-fluorouracil-based chemotherapy for colon cancer patients: is the CpG island methylator phenotype the 5-fluorouracil-responsive subgroup? In: *Int J Clin Oncol* 13 (6), S. 498–503.
- Imai, Kohzoh; Yamamoto, Hiroyuki (2008): Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. In: *Carcinogenesis* 29 (4), S. 673–680.
- Ionov, Y.; Peinado, M. A.; Malkhosyan, S.; Shibata, D.; Perucho, M. (1993): Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. In: *Nature* 363 (6429), S. 558–561.
- Issa, Jean-PierreJ; Shen, Lanlan; Toyota, Minoru (2005): CIMP, at last. In: *Gastroenterology* 129 (3), S. 1121–1124.
- Iwashita, Shintaro; Song, Si-Young (2008): RasGAPs: a crucial regulator of extracellular stimuli for homeostasis of cellular functions. In: *Mol Biosyst* 4 (3), S. 213–222.
- JACKMAN, R. J.; MAYO, C. W. (1951): The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. In: *Surg Gynecol Obstet* 93 (3), S. 327–330.
- Jass, J. R. (2007): Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. In: *Histopathology* 50 (1), S. 113–130.
- Jass, J. R.; Stewart, S. M. (1992): Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. In: *Gut* 33 (6), S. 783–786.
- Jones, P. A.; Laird, P. W. (1999): Cancer epigenetics comes of age. In: *Nat Genet* 21 (2), S. 163–167.
- Jover, Rodrigo; Nguyen, Thuy-Phuong; Perez-Carbonell, Lucia; Zapater, Pedro; Paya, Artemio; Alenda, Cristina et al. (2011): 5-Fluorouracil adjuvant chemotherapy does not increase survival in patients with CpG island methylator phenotype colorectal cancer. In: *Gastroenterology* 140 (4), S. 1174–1181.
- Kambara, T. (2004): BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. In: *Gut* 53 (8), S. 1137–1144.

- Kane, M. F.; Loda, M.; Gaida, G. M.; Lipman, J.; Mishra, R.; Goldman, H. et al. (1997): Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. In: *Cancer Res* 57 (5), S. 808–811.
- Kaneda, Atsushi; Yagi, Koichi (2011): Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. In: *Cancer Sci* 102 (1), S. 18–24.
- Karpinski, Pawel; Myszka, Aleksander; Ramsey, David; Misiak, Blazej; Gil, Justyna; Laczmanska, Izabela et al. (2010): Polymorphisms in methyl-group metabolism genes and risk of sporadic colorectal cancer with relation to the CpG island methylator phenotype. In: *Cancer Epidemiol* 34 (3), S. 338–344.
- Khosravi-Far, R.; Campbell, S.; Rossman, K. L.; Der, C. J. (1998): Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. In: *Adv. Cancer Res* 72, S. 57–107.
- Kim, JungHo; Shin, SoHyun; Kwon, HyeongJu; Cho, NamYun; Kang, GyeongHoon (2009): Prognostic implications of CpG island hypermethylator phenotype in colorectal cancers. In: *Virchows Arch* 455 (6), S. 485–494.
- Kinzler, Kenneth W.; Vogelstein, Bert (1996): Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. In: *Cell* 87 (2), S. 159–170.
- Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. (1997): Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. In: *Nature* 386 (6627), S. 761, 763.
- Knudson, A. G. (1996): Hereditary cancer: two hits revisited. In: *J. Cancer Res. Clin. Oncol* 122 (3), S. 135–140.
- Kops, GeertJPL; Weaver, BethAA; Cleveland, DonW (2005): On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. In: *Nat Rev Cancer* 5 (10), S. 773–785.
- Korinek, V.; Barker, N.; Morin, P. J.; van, WichenD; de, WegerR; Kinzler, K. W. et al. (1997): Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. In: *Science* 275 (5307), S. 1784–1787.
- Kurukuti, Sreenivasulu; Tiwari, Vijay Kumar; Tavoosidana, Gholamreza; Pugacheva, Elena; Murrell, Adele; Zhao, Zhihu et al. (2006): CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103 (28), S. 10684–10689.
- Laird, PeterW (2005): Cancer epigenetics. In: *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1, S. R65–76.
- Lee, Sun; Cho, Nam-Yun; Choi, Minhee; Yoo, EunJ; Kim, Jung-Ho; Kang, GyeongH (2008): Clinicopathological features of CpG island methylator phenotype-positive colorectal cancer and its adverse prognosis in relation to KRAS/BRAF mutation. In: *Pathol Int* 58 (2), S. 104–113.
- Lee, Sun; Cho, Nam-Yun; Yoo, EunJoo; Kim, JungHo; Kang, GyeongHoon (2008): CpG island methylator phenotype in colorectal cancers: comparison of the new and classic CpG island methylator phenotype marker panels. In: *Arch Pathol Lab Med* 132 (10), S. 1657–1665.
- Leggett, Barbara; Whitehall, Vicki (2010): Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. In: *Gastroenterology* 138 (6), S. 2088–2100.
- Leighton, P. A.; Saam, J. R.; Ingram, R. S.; Stewart, C. L.; Tilghman, S. M. (1995): An enhancer deletion affects both H19 and Igf2 expression. In: *Genes Dev* 9 (17), S. 2079–

2089.

Lengauer, C.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. (1997): Genetic instability in colorectal cancers. In: *Nature* 386 (6625), S. 623–627.

Lichtenstein, P.; Holm, N. V.; Verkasalo, P. K.; Iliadou, A.; Kaprio, J.; Koskenvuo, M. et al. (2000): Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. In: *N. Engl. J. Med* 343 (2), S. 78–85.

Lujambio, Amaia; Roperio, Santiago; Ballestar, Esteban; Fraga, Mario F.; Cerrato, Celia; Setién, Fernando et al. (2007): Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. In: *Cancer Res* 67 (4), S. 1424–1429.

Lynch, Henry T.; de laChapelle Albert (2003): Hereditary colorectal cancer. In: *N Engl J Med* 348 (10), S. 919–932.

Lynch, H. T.; Smyrk, T.; McGinn, T.; Lanspa, S.; Cavalieri, J.; Lynch, J. et al. (1995): Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. In: *Cancer* 76 (12), S. 2427–2433.

Markowitz, S.; Wang, J.; Myeroff, L.; Parsons, R.; Sun, L.; Lutterbaugh, J. et al. (1995): Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. In: *Science* 268 (5215), S. 1336–1338.

McGivern, A.; Wynter, C. V. A.; Whitehall, V. L. J.; Kambara, T.; Spring, K. J.; Walsh, M. D. et al. (2004): Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. In: *Fam. Cancer* 3 (2), S. 101–107.

Menon, A. G.; Anderson, K. M.; Riccardi, V. M.; Chung, R. Y.; Whaley, J. M.; Yandell, D. W. et al. (1990): Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 87 (14), S. 5435–5439.

Min, Byung-Hoon; Bae, Jeong Mo; Lee, Eui Jin; Yu, Hong Suk; Kim, Young-Ho; Chang, Dong Kyung et al. (2011): The CpG island methylator phenotype may confer a survival benefit in patients with stage II or III colorectal carcinomas receiving fluoropyrimidine-based adjuvant chemotherapy. In: *BMC Cancer* 11, S. 344.

Morin, P. J.; Sparks, A. B.; Korinek, V.; Barker, N.; Clevers, H.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. (1997): Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. In: *Science* 275 (5307), S. 1787–1790.

Morson, B. (1974): President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel. In: *Proc. R. Soc. Med* 67 (6 Pt 1), S. 451–457.

Nagasaka, Takeshi; Sasamoto, Hiromi; Notohara, Kenji; Cullings, Harry M.; Takeda, Masanori; Kimura, Keigo et al. (2004): Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. In: *J Clin Oncol* 22 (22), S. 4584–4594.

Noffsinger, Amy E (2009): Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. In: *Annu Rev Pathol* 4, S. 343–364.

Nosho, Katsuhiko; Irahara, Natsumi; Shima, Kaori; Kure, Shoko; Kirkner, Gregory J.; Schernhammer, Eva S et al. (2008): Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample. In: *PLoS One* 3 (11), S. e3698.

- Nosho, Katsuhiko; Kure, Shoko; Irahara, Natsumi; Shima, Kaori; Baba, Yoshifumi; Spiegelman, Donna et al. (2009): A prospective cohort study shows unique epigenetic, genetic, and prognostic features of synchronous colorectal cancers. In: *Gastroenterology* 137 (5), S. 1609-20.e1-3.
- O'Brien, Michael J.; Yang, Shi; Mack, Charline; Xu, Huihong; Huang, Christopher S.; Mulcahy, Elizabeth et al. (2006): Comparison of Microsatellite Instability, CpG Island Methylation Phenotype, BRAF and KRAS Status in Serrated Polyps and Traditional Adenomas Indicates Separate Pathways to Distinct Colorectal Carcinoma End Points. In: *The American Journal of Surgical Pathology* 30 (12), S. 1491–1501.
- O'Brien, Michael J.; Yang, Shi; Clebanoff, Jennifer L.; Mulcahy, Elizabeth; Farrar, Francis A.; Amoroso, Mark; Swan, Niall (2004): Hyperplastic (serrated) polyps of the colorectum: relationship of CpG island methylator phenotype and K-ras mutation to location and histologic subtype. In: *Am J Surg Pathol* 28 (4), S. 423–434.
- Ogino, S.; Cantor, M.; Kawasaki, T.; Brahmandam, M.; Kirkner, G. J.; Weisenberger, D. J. et al. (2006): CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. In: *Gut* 55 (7), S. 1000–1006.
- Ogino, Shuji; Chan, Andrew T.; Fuchs, Charles S.; Giovannucci, Edward (2011): Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: an emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. In: *Gut* 60 (3), S. 397–411.
- Ogino, Shuji; Chan, Andrew T.; Fuchs, Charles S.; Giovannucci, Edward (2011): Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: an emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. In: *Gut* 60 (3), S. 397–411.
- Ogino, Shuji; Goel, Ajay (2008): Molecular Classification and Correlates in Colorectal Cancer. In: *The Journal of Molecular Diagnostics* 10 (1), S. 13–27.
- Ogino, Shuji; Kawasaki, Takako; Kirkner, Gregory J.; Loda, Massimo; Fuchs, Charles S. (2006): CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer: possible associations with male sex and KRAS mutations. In: *J Mol Diagn* 8 (5), S. 582–588.
- Ogino, Shuji; Kawasaki, Takako; Kirkner, Gregory J.; Kraft, Peter; Loda, Massimo; Fuchs, Charles S. (2007): Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. In: *J Mol Diagn* 9 (3), S. 305–314.
- Ogino, Shuji; Meyerhardt, Jeffrey A.; Kawasaki, Takako; Clark, Jeffrey W.; Ryan, David P.; Kulke, Matthew H. et al. (2007): CpG island methylation, response to combination chemotherapy, and patient survival in advanced microsatellite stable colorectal carcinoma. In: *Virchows Arch* 450 (5), S. 529–537.
- Ogino, Shuji; Meyerhardt, Jeffrey A.; Irahara, Natsumi; Niedzwiecki, Donna; Hollis, Donna; Saltz, Leonard B. et al. (2009): KRAS mutation in stage III colon cancer and clinical outcome following intergroup trial CALGB 89803. In: *Clin. Cancer Res* 15 (23), S. 7322–7329.
- Ogino, S.; Nosho, K.; Kirkner, G. J.; Kawasaki, T.; Meyerhardt, J. A.; Loda, M. et al. (2008): CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. In: *Gut* 58 (1), S. 90–96.
- Ogino, Shuji; Odze, Robert D.; Kawasaki, Takako; Brahmandam, Mohan; Kirkner, Gregory J.; Laird, Peter W. et al. (2006): Correlation of Pathologic Features With CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) by Quantitative DNA Methylation Analysis in

- Colorectal Carcinoma. In: *The American Journal of Surgical Pathology*, S. 1175–1183.
- Ohlsson, R.; Nyström, A.; Pfeifer-Ohlsson, S.; Töhhönen, V.; Hedborg, F.; Schofield, P. et al. (1993): IGF2 is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith-Wiedemann syndrome. In: *Nat. Genet* 4 (1), S. 94–97.
- Park, Jane; Betel, Doron; Gryfe, Robert; Michalickova, Katerina; Di, Nicola Nando; Gallinger, Steven et al. (2002): Mutation profiling of mismatch repair-deficient colorectal cancers using an in silico genome scan to identify coding microsatellites. In: *Cancer Res* 62 (5), S. 1284–1288.
- Park, Seog-Yun; Kim, Baek-Hee; Kim, JeongHo; Cho, Nam-Yun; Choi, Minhee; Yu, EunJoo et al. (2007): Methylation profiles of CpG island loci in major types of human cancers. In: *J Korean Med Sci* 22 (2), S. 311–317.
- Park, Seun-Ja; Rashid, Asif; Lee, Jae-Hyuk; Kim, SangGeol; Hamilton, Stanley R; Wu, Tsung-Teh (2003): Frequent CpG island methylation in serrated adenomas of the colorectum. In: *Am J Pathol* 162 (3), S. 815–822.
- Parks, T. G.; Bussey, H. F.; Lockhart-Mummery, H. E. (1970): Familial polyposis coli associated with extracolonic abnormalities. In: *Gut* 11 (4), S. 323–329.
- Parsons, R.; Li, G. M.; Longley, M. J.; Fang, W. H.; Papadopoulos, N.; Jen, J. et al. (1993): Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. In: *Cell* 75 (6), S. 1227–1236.
- Peeters, Marc; Oliner, Kelly S.; Parker, Alex; Siena, Salvatore; van Cutsem, Eric; Huang, Jing et al. (2013): Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. In: *Clin. Cancer Res* 19 (7), S. 1902–1912.
- Pino, Maria S.; Chung, Daniel C. (2010): The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. In: *Gastroenterology* 138 (6), S. 2059–2072.
- Powell, Steven M.; Zilz, Nathan; Beazer-Barclay, Yasmin; Bryan, Tracy M.; Hamilton, Stanley R.; Thibodeau, Stephen N. et al. (1992): APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. In: *Nature* 359 (6392), S. 235–237.
- Rajagopalan, Harith; Bardelli, Alberto; Lengauer, Christoph; Kinzler, Kenneth W.; Vogelstein, Bert; Velculescu, Victor E. (2002): Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. In: *Nature* 418 (6901), S. 934.
- Rajagopalan, Harith; Lengauer, Christoph (2004): Aneuploidy and cancer. In: *Nature* 432 (7015), S. 338–341.
- Salovaara, R.; Loukola, A.; Kristo, P.; Kaariainen, H.; Ahtola, H.; Eskelinen, M. et al. (2000): Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. In: *J Clin Oncol* 18 (11), S. 2193–2200.
- Samowitz, Wade S (2007): The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. In: *J Mol Diagn* 9 (3), S. 281–283.
- Samowitz, Wade S; Albertsen, Hans; Herrick, Jennifer; Levin, Theodore R; Sweeney, Carol; Murtaugh, Maureen A et al. (2005): Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. In: *Gastroenterology* 129 (3), S. 837–845.
- Samowitz, Wade S; Albertsen, Hans; Sweeney, Carol; Herrick, Jennifer; Caan, Bette J; Anderson, Kristin E et al. (2006): Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. In: *J Natl Cancer Inst* 98 (23), S.



1731–1738.

Samowitz, W. S.; Curtin, K.; Schaffer, D.; Robertson, M.; Leppert, M.; Slattery, M. L. (2000): Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 9 (11), S. 1193–1197.

Samowitz, W. S.; Curtin, K.; Ma, K. N.; Schaffer, D.; Coleman, L. W.; Leppert, M.; Slattery, M. L. (2001): Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. In: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10 (9), S. 917–923.

Samowitz, W. S.; Curtin, K.; Lin, H. H.; Robertson, M. A.; Schaffer, D.; Nichols, M. et al. (2001): The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. In: *Gastroenterology* 121 (4), S. 830–838.

Schofield, Lyn; Watson, Natasha; Grieu, Fabienne; Li, Wei Qi; Zeps, Nik; Harvey, Jenet et al. (2009): Population-based detection of Lynch syndrome in young colorectal cancer patients using microsatellite instability as the initial test. In: *Int. J. Cancer* 124 (5), S. 1097–1102.

Schuebel, Kornel E.; Chen, Wei; Cope, Leslie; Glöckner, Sabine C.; Suzuki, Hiromu; Yi, Joo-Mi et al. (2007): Comparing the DNA Hypermethylome with Gene Mutations in Human Colorectal Cancer. In: *PLoS Genet* 3 (9), S. e157.

Seto, Motoko; Ohta, Miki; Ikenoue, Tsuneo; Sugimoto, Takafumi; Asaoka, Yoshinari; Tada, Motohisa et al. (2011): Reduced expression of RAS protein activator like-1 in gastric cancer. In: *Int. J. Cancer* 128 (6), S. 1293–1302.

Shen, L.; Catalano, P. J.; Benson, A. B.; O'Dwyer, P.; Hamilton, S. R.; Issa, J.-P. J. (2007): Association between DNA Methylation and Shortened Survival in Patients with Advanced Colorectal Cancer Treated with 5-Fluorouracil Based Chemotherapy. In: *Clinical Cancer Research* 13 (20), S. 6093–6098.

Shen, Lanlan; Toyota, Minoru; Kondo, Yutaka; Lin, E.; Zhang, Li; Guo, Yi et al. (2007): Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (47), S. 18654–18659.

Slattery, MarthaL; Curtin, Karen; Sweeney, Carol; Levin, TheodoreR; Potter, John; Wolff, RogerK et al. (2007): Diet and lifestyle factor associations with CpG island methylator phenotype and BRAF mutations in colon cancer. In: *Int J Cancer* 120 (3), S. 656–663.

Sparks, A. B.; Morin, P. J.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. (1998): Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. In: *Cancer Res* 58 (6), S. 1130–1134.

Sprang, S. R. (1997): G proteins, effectors and GAPs: structure and mechanism. In: *Curr. Opin. Struct. Biol* 7 (6), S. 849–856.

Sturt, N. J. H.; Gallagher, M. C.; Bassett, P.; Philp, C. R.; Neale, K. F.; Tomlinson, I. P. M. et al. (2004): Evidence for genetic predisposition to desmoid tumours in familial adenomatous polyposis independent of the germline APC mutation. In: *Gut* 53 (12), S. 1832–1836.

Symons, M.; Settleman, J. (2000): Rho family GTPases: more than simple switches. In: *Trends Cell Biol* 10 (10), S. 415–419.

Takai, Y.; Sasaki, T.; Matozaki, T. (2001): Small GTP-binding proteins. In: *Physiol. Rev* 81

(1), S. 153–208.

Tanaka, Noriko; Huttenhower, Curtis; Nosh, Katsuhiko; Baba, Yoshifumi; Shima, Kaori; Quackenbush, John et al. (2010): Novel application of structural equation modeling to correlation structure analysis of CpG island methylation in colorectal cancer. In: *Am J Pathol* 177 (6), S. 2731–2740.

Teodoridis, JensM; Hardie, Catriona; Brown, Robert (2008): CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications. In: *Cancer Lett* 268 (2), S. 177–186.

Thibodeau, S. N.; Bren, G.; Schaid, D. (1993): Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. In: *Science* 260 (5109), S. 816–819.

Tilghman, S. M.; Bartolomei, M. S.; Webber, A. L.; Brunkow, M. E.; Saam, J.; Leighton, P. A. et al. (1993): Parental imprinting of the H19 and Igf2 genes in the mouse. In: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 58, S. 287–295.

Toyota, M.; Ohe-Toyota, M.; Ahuja, N.; Issa, J. P. (2000): Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2), S. 710–715.

Vakiani, Efsevia; Yantiss, RhondaK (2009): Pathologic features and biologic importance of colorectal serrated polyps. In: *Adv Anat Pathol* 16 (2), S. 79–91.

van Rijnsoever, Marius; Elsaleh, Hany; Joseph, David; McCaul, Kieran; Iacopetta, Barry (2003): CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. In: *Clin. Cancer Res* 9 (8), S. 2898–2903.

van Rijnsoever, M.; Grieu, F.; Elsaleh, H.; Joseph, D.; Iacopetta, B. (2002): Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. In: *Gut* 51 (6), S. 797–802.

van, EngelandManon; Weijenberg, MattyP; Roemen, GuidoMJM; Brink, Mirian; de, BruineAdriaanP; Goldbohm, RAlexandra et al. (2003): Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands cohort study on diet and cancer. In: *Cancer Res* 63 (12), S. 3133–3137.

Vaughn, Cecily P.; Wilson, Andrew R.; Samowitz, Wade S. (2009): Quantitative evaluation of CpG island methylation in hyperplastic polyps. In: *Mod Pathol* 23 (1), S. 151–156.

Walker, Simon A.; Kupzig, Sabine; Bouyoucef, Dalila; Davies, Louise C.; Tsuboi, Takashi; Bivona, Trevor G. et al. (2004): Identification of a Ras GTPase-activating protein regulated by receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> oscillations. In: *EMBO J* 23 (8), S. 1749–1760.

Ward, M. P.; Gimeno, C. J.; Fink, G. R.; Garrett, S. (1995): SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. In: *Mol. Cell. Biol* 15 (12), S. 6854–6863.

Ward, RobynLynne; Turner, Jenny; Williams, Rachel; Pekarsky, Brita; Packham, Deborah; Velickovic, Marija et al. (2005): Routine testing for mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer is justified. In: *J Pathol* 207 (4), S. 377–384.

Weisenberger, DanielJ; Siegmund, KimberlyD; Campan, Mihaela; Young, Joanne; Long, TiffanyI; Faasse, MarkA et al. (2006): CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. In: *Nat Genet* 38 (7), S. 787–793.

- Whitehall, Vicki L. J.; Wynter, Coral V. A.; Walsh, Michael D.; Simms, Lisa A.; Purdie, David; Pandeya, Nirmala et al. (2002): Morphological and molecular heterogeneity within nonmicrosatellite instability-high colorectal cancer. In: *Cancer Res* 62 (21), S. 6011–6014.
- Wood, L. D.; Parsons, D. W.; Jones, S.; Lin, J.; Sjoblom, T.; Leary, R. J. et al. (2007): The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers. In: *Science* 318 (5853), S. 1108–1113.
- Worthley, Daniel-L.; Whitehall, Vicki-L.; Spring, Kevin-J.; Leggett, Barbara-A (2007): Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. In: *World J Gastroenterol* 13 (28), S. 3784–3791.
- Yagi, Koichi; Akagi, Kiwamu; Hayashi, Hiroshi; Nagae, Genta; Tsuji, Shingo; Isagawa, Takayuki et al. (2010): Three DNA methylation epigenotypes in human colorectal cancer. In: *Clin Cancer Res* 16 (1), S. 21–33.
- Yamashita, Kentaro; Dai, Tomoko; Dai, Yuichi; Yamamoto, Fumiichiro; Perucho, Manuel (2003): Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. In: *Cancer Cell* 4 (2), S. 121–131.
- Yokozaki, H.; Budillon, A.; Tortora, G.; Meissner, S.; Beaucage, S. L.; Miki, K.; Cho-Chung, Y. S. (1993): An antisense oligodeoxynucleotide that depletes RI alpha subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase induces growth inhibition in human cancer cells. In: *Cancer Res* 53 (4), S. 868–872.

## 8 Anhang

PCR-Protokoll für MethyQESD von IGF2, NEUROG1 und RASAL1 (bitte unterschiedliche Schmelzpunkte beachten, siehe 3.3.2.3)

### Experimental Protocol

Program:		Denaturierung			Type:	None		Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode		
1	95	900	20	0	0	0	None		

Program:	Amplifizierung				Type:	Quantification		Cycles:	45
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode		
1	95	15	20	0	0	0	None		
2	66	20	20	0	0	0	Single		

Program:	Schmelzkurve				Type:	None		Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode		
1	95	5	20	0	0	0	None		
2	60	5	20	0	0	0	None		
3	99	1	0.2	0	0	0	Continuous		
4	40	20	20	0	0	0	None		

Fluorescence Settings			
LED Power	CALIB	Display Mode	3.5 Compatible
Color	N/A		
Compensation	N/A		
Car. Movement	Continuous		

Quantification Settings			
Channel Setting	F1		
Program Name	Amplifizierung		
Start Time	0:16:01.7	Stop Time	0:55:17.25
Analysis	2nd Der Max	No. of Points	N/A
Baseline Adjust.	Arithmetic		
Noise Band	0.0527		
Crossing Line		Position	N/A
Slope	0.000		
Intercept	0.000		
r	0.00		
Error	0.000		

## PCR-Protokoll für MethyQESD von PRKACB:

**Experimental Protocol**

Program:	15 min Denat				Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	94	900	20	0	0	0	None	

Program:	Amplification				Type:	Quantification	Cycles:	45
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	10	20	0	0	0	None	
2	60	17	20	0	0	0	None	
3	72	8	3	0	0	0	None	
4	83	2	5	0	0	0	Single	

Program:	Melt				Type:	None	Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode	
1	95	2	20	0	0	0	None	
2	55	10	20	0	0	0	None	
3	98	0	0.2	0	0	0	Continuous	
4	45	10	20	0	0	0	None	

**Fluorescence Settings**

LED Power	CALIB	Display Mode	3.5 Compatible
Color	N/A		
Compensation	N/A		
Car. Movement	Continuous		

**Quantification Settings**

Channel Setting	F1		
Program Name	Amplification		
Start Time	0:16:16.65	Stop Time	1:03:16.2
Analysis	2nd Der Max	No. of Points	N/A
Baseline Adjust.	Arithmetic		
Noise Band	0.00512		
Crossing Line		Position	N/A
Slope	0.000		
Intercept	0.000		
r	0.00		
Error	0.000		

## PCR-Protokoll für RT-qPCR von RASAL1:

**Experimental Protocol**

Experimental Protocol									
Program:	Denat				Type:	None		Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode		
1	95	900	20	0	0	0	None		

Program:	2 Step Ampl				Type:	None		Cycles:	45
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode		
1	95	10	20	0	0	0	None		
2	65	20	20	0	0	0	Single		

Program:	Melt				Type:	None		Cycles:	1
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode		
1	95	2	20	0	0	0	None		
2	60	0	20	0	0	0	None		
3	98	0	0.15	0	0	0	Continuous		
4	45	20	20	0	0	0	None		

Fluorescence Settings			
LED Power	CALIB	Display Mode	3.5 Compatible
Color	N/A		
Compensation	N/A		
Car. Movement	Continuous		

Quantification Settings			
Channel Setting	F1		
Program Name	2 Step Ampl		
Start Time	0:15:54.85	Stop Time	0:50:35.1
Analysis	2nd Der Max	No. of Points	N/A
Baseline Adjust.	Arithmetic		
Noise Band	0.0638		
Crossing Line		Position	N/A
Slope	0.000		
Intercept	0.000		
r	0.00		
Error	0.000		

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatöse polyposis coli
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
CACNA1G	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1 G subunit
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CIMP	Cpg island methylator phenotype
CIMP	CpG-Insel-Methylator-Phänotyp
CIN	Chromosomale Instabilität
CIN	Chromosomale Instabilität
CpG	Cytosinphosphatguanin
CTCF	CCCTC-binding factor
DFS	Disease-free survival
DMR	Differentially methylated region
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FAP	Familiäre adenomatöse polyposis coli
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded
GAP	GTPase-activating protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GTP	Guanosintriphosphat
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
IGF2	Insulin-like growth factor 2
IHC	Immunhistochemie
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRK	Kolorektales Karzinom
LOH	Loss of heterozygosity
LOI	Loss of imprinting

MAPK	Mitogen-activated peptide kinase
MASPIN	mammary serine protease inhibitor
MLH	MutL homolog
MMR-Gen	Mismatch-repair-Gen
MSH	MutS protein homolog
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
NEUROG1	Neurogenin 1
OS	Overall survival
p16/CDKN2a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
PCR	Polymerase chain reaction
PITX1	Paired-like homeodomain transcription factor 1
PKA	Proteinkinase A
PMS	Postmeiotic segregation increased
PRKACB	Katalytische Untereinheit $\beta$ der Proteinkinase A
RASA	RAS p21 protein activator 1
RASAL1	RAS protein activator like 1
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RT-qPCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
RUNX3	Runt-related transcription factor 3
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
TAX1BP1	Human T-cell leukemia virus type I binding protein 1



## **Danksagung**

Bei Prof. Dr. Hofstädter möchte ich mich für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Pathologie der Universität Regensburg anfertigen zu können, bedanken.

Mein Dank gilt insbesondere meinem Doktorvater, Prof. Dr. Dietmaier, für sein offenes Ohr, seine Geduld und den gewährten Rückhalt.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Dr. Marcus Bettstetter, dessen Einführung in die Thematik den praktischen Teil der Arbeit erst in dieser Form ermöglicht hat.

Ferner danke ich allen MitarbeiterInnen des ZMD für die angenehme Atmosphäre und Unterstützung. Bei Dr. Simone Schuster bedanke ich mich für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Zudem gilt mein herzlicher Dank meiner Frau und meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung und Geduld.